Vol. VIII. N. 2-3 *Sped. in abb. postale - Gruppo IV* Giugno-Settembre 1947

RIVISTA
DI
PARASSITOLOGIA

DIRETTA DA A. MISSIROLI

PUBBLICAZIONE TRIMESTRALE



REDAZIONE E AMMINISTRAZIONE:
ROMA - VIA CARLO FEA, 15 - ROMA

NORME EDITORIALI

Gli articoli originali per la RIVISTA DI PARASSITOLOGIA dovranno essere indirizzati al *Prof. A. Missiroli, via Carlo Fea,* 15 - ROMA.

 Le opinioni espresse dagli Autori non impegnano la responsabilità del periodico. I contributi originali si accettano a condizione che non siano destinati ad altri periodici. In ottemperanza alle disposizioni del Consiglio Nazionale delle Ricerche ogni articolo dovrà essere corredato da un riassunto di non oltre 10 righe. Si consente la ristampa soltanto in seguito ad autorizzazione espressa dalla Direzione e citando la RIVISTA DI PARASSITOLOGIA.

In tipografia si accettano soltanto dattiloscritti. Sono concesse ai collaboratori 16 pagine di stampa; le pagine in più saranno addebitate agli autori. Lavori molto estesi potranno essere stampati come supplemento monografico della Rivista.

Si richiede che le figure da riprodurre siano nitide, con lettere o con diciture a caratteri grandi e tali che restino ben leggibili dopo eventuali riduzioni.

Gli estratti richiesti dagli Autori saranno concessi a prezzo di costo.

Le spese per *clichés,* tabelle, tavole ed eventuali variazioni apportate alle bozze di stampa sono a carico dell'Autore.

La bibliografia dovrà soddisfare le seguenti condizioni per ogni citazione: 1° cognome dell'Autore citato; 2° iniziale del nome; 3° anno di pubblicazione, fra parentesi; 4° titolo del lavoro (è facoltativo inserire o tralasciare tutti i titoli); 5° titolo della rivista; 6° numero del volume; 7° numero delle pagine. Per es.:

GRASSI B. (1921). **Osservazioni sulla biologia degli anofeli.** ***Ann. d'Igiene*, 31, 1-4.**

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

STUDI SULLO SVILUPPO E SULLA STRUTTURA DI *SCHISTOSOMA HAEMATOBIUM* NEL MOLLUSCO OSPITE INTERMEDIO (*)

Dott. FRANCO BOSCARDI

Istituto di Clinica Medica Generale dell'Università di Roma
Direttore: Prof. C. Frugoni

Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma
Direttore inc.: Prof. V. Vanni

Il ciclo biologico della maggior parte dei trematodi, specialmente nella fase della moltiplicazione partenogenetica, è ancora poco conosciuto.

Le trasformazioni che i vermi di questo ordine compiono negli ospiti intermedi sono quanto mai diverse da un genere all'altro; la differenza più nota è quella riguardante il succedersi degli stadi di moltiplicazione larvale: in alcuni di essi, come avviene ad es. per il genere *Fasciola* (*Fasc. hepatica, Fasc. gigantica,* parassita di erbivori), si passa dal miracidio allo stadio di sporocisti, indi a quello di redia, che a sua volta dà luogo a redie figlie, nelle quali si sviluppano infine le cercarie; in altri, come nel genere Schistosoma, cui appartengono specie importanti per la patologia umana, viene saltata la fase di redia e dalla sporocisti primaria si formano sporocisti secondarie nelle quali si sviluppano le cercarie; in altri si verifica una semplice trasformazione dal miracidio alla sporocisti, in cui maturano le cercarie (ad es. genere *Ptychogonimus*: *P. megastoma,* parassita di pesci); in altri infine, come ad es. nel genere *Monostomum* (*M. mutabile, M. flavum, Parorchis vitus,* parassiti di uccelli acquatici), il miracidio che schiude dall'uovo nell'utero del verme adulto, racchiude al momento della sua emissione una redia tipica; lo stadio di sporocisti è quindi saltato.

(*) I più vivi ringraziamenti al Prof. V. VANNI, che mi è stato di consiglio e di aiuto nello svolgimento del lavoro.

Ma a parte queste differenze, diremo così grossolane, ne esistono molte altre di dettaglio assai poco note, anche per quei trematodi parassiti dell'uomo che pure sono stati oggetto di numerosissime ricerche.

Scopo della presente nota è appunto quello di illustrare nei suoi particolari il ciclo larvale di *Schistosoma haematobium* che è stato da precedenti AA. incompletamente o imperfettamente descritto. In tutti i testi classici ed in tutti i lavori a carattere particolare o monografico il ciclo larvale degli schistosomi è schematizzato pedissequamente nei termini che in breve riassumiamo e che ripetono la descrizione riportata da LEIPER e ATKINSON (1) nella loro prima relazione del 1915.

Secondo tale descrizione il miracidio, liberatosi dall'uovo immerso nell'acqua, penetrerebbe attivamente nel mollusco ospite intermedio, abitualmente il *Bulinus contortus* o la *Physopsis africana*, attraverso i tegumenti. Si sostiene che la penetrazione avvenga in corrispondenza del capo, dei tentacoli e del piede del mollusco anche in base alle osservazioni di LUTZ (2) sull'infestazione del *Planorbis centimetralis* e del *Pl. olivaceus* da parte dei miracidi di *Schistosoma mansoni;* i miracidi penetrati nello spessore del mantello ed in particolare nei tentacoli, trasformandosi in sporocisti, vi produrrebbero delle deformazioni tali da poter essere notate anche macroscopicamente. Nella sporocisti primaria, o sporocisti madre si formerebbero le sporocisti secondarie, o figlie, la quali giunte a maturazione, emigrerebbero nell'epatopancreas del mollusco. Dette sporocisti figlie prolificherebbero dando luogo a ramificazioni succiformi ed in esse si svilupperebbero le cercarie.

Si ritiene che il miracidio possa penetrare nel mollusco anche attraverso il polmone, così come avviene per la *Fasciola hepatica* in *Limnaea,* ivi trasformarsi in sporocisti che seguirebbe poi l'ulteriore evoluzione.

Le sporocisti figlie, giunte nell'epatopancreas del mollusco, vi si svilupperebbero ed invaderebbero l'organo con i loro prolungamenti sacciformi, producendone gradualmente l'atrofia. Nelle ramificazioni sporocistiche evolverebbero le cercarie che giunte a maturazione, per effrazione delle sporocisti, verrebbero messe in libertà. Non è ben noto per quale via le cercarie raggiungano l'ambiente esterno; secondo alcuni, in seguito alla rottura della capsula epatica in corrispondenza delle diramazioni sporocistiche le cercarie verrebbero riversate nello spazio compreso fra il corpo del mollusco ed il suo guscio e quindi perforando la piega del mantello, limitante detta cavità lungo il bordo del guscio, guadagnerebbero l'ambiente esterno.

Questa la descrizione del ciclo larvale degli Schistosomi parassiti del-

(1) LEIPER R. T., ATKINSON E. L.: *Brit. Med. J., 30,* 201, 1915.
(2) LUTZ A,: *C. R. Soc. Biol. 116,* 1149, 1934.

l'uomo, riportata in tutti i testi classici (BRUMPT (3), NEVEU LEMAIRE (4), FAUST (5), GIRGES (6) ed universalmente accettata. Tale descrizione alla prova sperimentale ci sembrò superficiale ed inesatta e ci spinse a studiare più a fondo l'argomento.

Invero le difficoltà di tale studio sono notevoli e molteplici e presuppongono una profonda conoscenza della biologia dei Trematodi in genere, nonchè dell'anatomia e della fisiologia dei molluschi ospiti intermedi. A parte ciò occorre tener presente che una medesima specie di mollusco è spesso ospite intermedio di diversi Trematodi che possono in esso evolvere e svilupparsi contemporaneamente. A noi stessi è occorso cadere in errore sull'inizio delle nostre ricerche, in quanto avendo infestato sperimentalmente con *Schistosoma haematobium* alcuni lotti di *Bulinus contortus* e di *Physopsis africana*, provenienti da zone sicuramente indenni da schistosomiasi e tenuti a lungo in osservazione per constatare l'eventuale emissione di cercarie, quando ci accingemmo a studiare i risultati dell'infestazione, ci trovammo in alcuni casi di fronte ad elementi parassitari diversi che erroneamente interpretammo come fasi di evoluzione del parassita in istudio e che poi ad un esame più approfondito ci si rilevarono dovuti alla contemporanea infestazione di un altro Trematode, una specie di echinostoma non ben identificabile e che è stato oggetto di altro nostro lavoro (7).

Nelle nostre ricerche sperimentali abbiamo cercato di cogliere ogni particolare sullo sviluppo e sulla struttura di *Schistosoma haematobium* nel mollusco ospite.

Anzitutto ci siamo interessati di accertare attraverso quale organo il miracidio fosse solito penetrare nel mollusco, nel nostro caso in *Bulinus contortus* e in *Physopsis africana*. A tale scopo uova di *S. haem.*, prelevate da urine di soggetti infestati, mediante arricchimento, lavate in soluzione leggermente ipertonica di cloruro di sodio, vennero immesse in una piccola capsula di Petri contenente acqua di fonte, nella quale le uova stesse si schiudevano rapidamente mettendo in libertà il miracidio. Nel medesimo recipiente si poneva quindi un mollusco e con l'aiuto di una lente a forte ingrandimento si seguì il comportamento dei miracidi nei riguardi dell'ospite per essi abituale.

Nonostante accurate e prolungate osservazioni non ci fu mai dato di sorprendere un miracidio nell'atto di aderire, nè tanto meno di penetrare

---

(3) BRUMPT E.: Precis de Parasitologie. Masson Ed., Paris, 1936.
(4) NEVEU LEMAIRE M.: Traité d'Helmintologie Médicale et Vetérinaire. Vigot Fr. Ed., Paris, 1941.
(5) FAUST E. C.: Human Helmintology. Kimpton Ed., London, 1930.
(6) GIRGES R.: Schistosomiasis. Bale Sons & Danielsson Ed., London, 1934.
(7) BOSCARDI F.: *Riv. Parassitol.*, *8*, 1947.

attraverso il sottile epitelio della membrana polmonare abitualmente spiegata nell'acqua ambiente.

Talvolta un miracidio scompariva sotto il piede del mollusco, in prossimità del capo, senza che peraltro fosse possibile individuare se e per quale via il miracidio fosse penetrato nell'ospite.

Sezionando il mollusco sia subito dopo tale operazione, sia a distanza di ore e di giorni dalla presunta infestazione, in diversi lotti di *Bulinus* e di *Physopsis*, ed esaminandone accuratamente in tutto lo spessore le antenne, il mantello ed il polmone, a fresco fra porta e copri oggetto ed in sezioni colorate in serie, non ci fu mai possibile notare la presenza di miracidi nel loro abituale aspetto o nella fase di trasformazione sporocistica.

In alcuni molluschi così infestati, esaminati a distanza di ore o di pochi giorni dall'infestazione riscontrammo invece la presenza di giovani sporocisti nel tessuto lasso periesofageo e periintestinale. Tale reperto convalidò l'ipotesi che l'infestazione dei molluschi non avvenga attraverso i tegumenti, come da tutti gli AA. si afferma, bensì per via orale. I miracidi cioè, in virtù di uno speciale tropismo, penetrerebbero attivamente nella cavità orale del mollusco, verrebbero ingeriti e giunti nell'esofago e nell'intestino ne attraverserebbero la parete, migrando nel tessuto lasso periesofageo e periintestinale, dove iniziano la fase di trasformazione sporocistica.

Si verificherebbe cioè per *S. haem.* quello che Faust (5) ritiene avvenga per *Clonorchis sinensis* in *Bythinia*. Le uova di questo trematode, pervenute negli stagni, sparse sulle erbe acquatiche, verrebbero deglutite attivamente dal mollusco. Una volta deglutito l'uovo schiuderebbe ed il miracidio, attraversando la parete dell'esofago, perverrebbe nello spazio linfatico periesofageo ed ivi si trasformerebbe in sporocisti. Quindi la via di penetrazione di *S. haem.* nel mollusco ospite non è nuova per i Trematodi, con la sola differenza che in *S. haem.* è il miracidio che si offre attivamente al mollusco per essere deglutito, mentre in *C. sinensis* è l'uovo che accidentalmente viene assunto dal mollusco che di erbe acquatiche si nutre.

La nostra ipotesi fu convalidata dagli esami istologici di alcuni molluschi, in cui gli organi furono sezionati in serie. Nella seguente microfotografia (fig. 1) di sezione interessante il tessuto lasso periesofageo di un mollusco, infestato sperimentalmente per tre giorni consecutivi con miracidi di *S. haem.*, ed ucciso in quinta giornata dalla prima infestazione, si nota la presenza di alcune sporocisti nella prima fase di sviluppo. Delle tre sporocisti interessate per esteso nel taglio, in quella a sinistra si può ancora individuare, per la conformazione ovoidale, per la presenza del bottone cefalico e per la persistenza delle cilia sulla cuticola, un miracidio sull'inizio della sua trasformazione.

Da notare che su altre sezioni dello stesso mollusco si riscontrarono,

sempre nel tessuto lasso periesofageo, diverse altre sporocisti in via di sviluppo.

In molti dei molluschi esaminati si osservò la contemporanea infestazione di metacercarie di una specie di *Echinostoma* non identificabile di cui nella microfotografia ora illustrasta se ne vedono alcune sezionate. E' noto

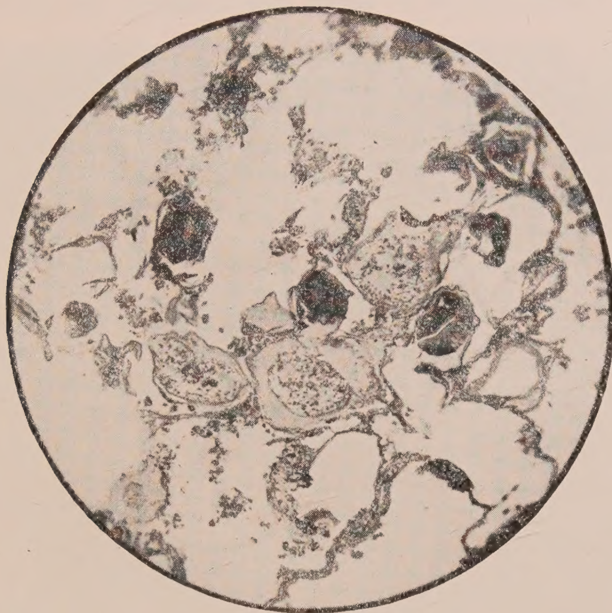


FIG. 1. — Sezione istologica interessante il tessuto lasso periesofageo di *Bulinus contortus* sottoposto a più cariche infestanti ed ucciso in 5ª giornata dalla prima carica ed in 2ª giornata dall'ultima carica infestànte.

Si nota la presenza di alcune sporocisti, di cui tre sono interessate per esteso nel taglio; delle tre sporocisti (sporocisti primarie) quella a sinistra ricorda il miracidio da cui origina, per la forma ovoidale, per la presenza della papilla cefalica (rostro) e la persistenza delle cilia vibratili sulla superficie esterna della cuticola. Le altre due sporocisti, più avanzate nello sviluppo (miracidi della prima carica infestante) hanno assunto forma irregolare e si sono notevolmente ingrandite. Entro le sporocisti si notano le cellule germinative in via di accrescimento.

Oltre alle sporocisti di *S. haem.* ora descritte, si nota la presenza di altri elementi parassitari; trattasi di alcune metacercarie di una specie di *Echinostoma* non individuato, da cui il mollusco era naturalmente infestato.

La presenza delle sporocisti nel tessuto periesofageo e periintestinale convalida l'ipotesi che l'infestazione del mollusco da parte di Sch. haem. avvenga per via orale, per ingestione dei miracidi. (Obb. 3, Oc. 4, diam. 85).

che molti molluschi acquatici, oltre ad essere ospiti intermedi dei trematodi in genere, nello stadio della moltipicazione partenogenetica, sono spesso anche secondi ospiti di metacercarie di uccelli acquatici che dei molluschi si nutrono. La presenza di tali metacercarie nel tessuto lasso periesofageo, e soltanto in tale tessuto, è la dimostrazione della via seguita sia dalle cer-

carie dell'*Echinostoma*, sia dai miracidi dello *Schistosoma* nell'infestare il mollusco, e cioè attraverso i primi tratti del tubo digerente dopo ingestione delle larve.

Per la rapida suddivisione e moltiplicazione delle cellule germinative la sporocisti va rapidamente aumentando di volume, ed adattandosi alla struttura dei tessuti assume le forme più irregolari. Le sporocisti sono co-

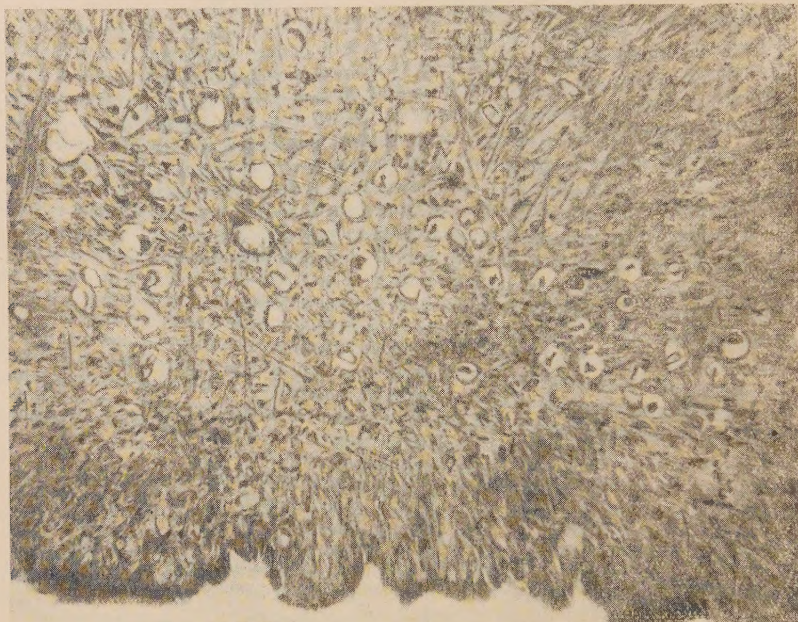


FIG. 2. — Sezione di piede di *Bulinus*, in 35ª giornata dall'infestazione sperimentale.

Nel tessuto muscolare del piede si nota la presenza di inclusioni parassitarie in via di degenerazione, rappresentate per lo più da residui di pareti cistiche, prive di contenuto.

Le cellule embrionali, disseminate dopo la rottura delle sporocisti, non hanno potuto compiere la normale evoluzione in un tessuto inadatto al loro sviluppo. (Obb. 3, Oc. 4 orto plan., diam. 85).

stituite, come è noto, da una membrana, o sacco cistico, contenente le cellule germinative, e sono prive di qualsiasi organo. E' difficile dire se le cellule embrionali aumentino di numero per ripetuti processi di suddivisione o per la formazione di nuove cellule da uno o più centri germinativi, chiamati ovari, che secondo la specie dei trematodi possono essere liberi nella cavità della sporocisti o circoscritti ad uno o più punti della parete. Nelle nostre osservazioni non ci è stato possibile mettere in evidenza alcuno di tali centri germinativi.

Per le ragioni che spiegheremo oltre, noi riteniamo che le sporocisti madri, giunte ad un certo grado di sviluppo, per la pressione esercitata dal continuo aumento delle cellule germinative, si lacerino e le cellule stesse, sparse nel tessuto lasso periesofageo, attraverso gli spazi lacunari e la circolazione generale, vengono in secondo tempo disseminate in tutti gli organi e tessuti del mollusco; ciò che ci è stato possibile osservare su sezioni

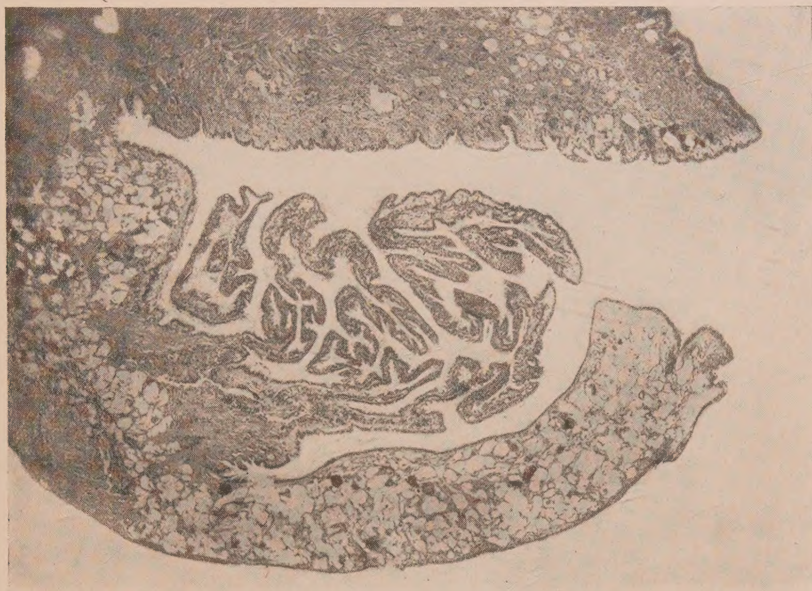


FIG. 3. — Sezione di polmone di *Bulinus* c. normale. Il polmone di questi molluschi è costituito da una sottile plicatura del mantello, adattata alla respirazione, composta di due strati cellulari fra i quali trovasi il pigmento respiratorio e fra cui scorre la linfa. Tale plicatura, ripiegata più volte su se stessa, è contenuta, nello stato di riposo, fra due grossi lembi del mantello, che, accostandosi per i margini liberi vengono a delimitare una cavità: la camera polmonare. La camera polmonare comunica con l'esterno a mezzo di una fessura, attraverso la quale, durante la respirazione il polmone viene estroflesso e dispiegato nell'acqua ambiente. (Obb. 3, Oc. 0, diam. 45).

istologiche in serie interessanti il mollusco per intero di cui riportiamo alcune dimostrative microfotografie.

Quindi, a nostro giudizio, nella sporocisti madre non si formano le sporocisti figlie che, secondo la descrizione classica, dalla sede di primo impianto migrano nell'epato-pancreas del mollusco, ma si tratta di una disseminazione passiva delle cellule germinative messe in libertà dalla sporocisti madre. Ed invero non sapremmo come spiegarci come un elemento sacciforme, quale è la sporocisti di *S. haem.*, priva di qualsiasi elemento atto alla locomozione, di dimensioni notevoli, possa trasferirsi attivamente da un organo all'altro.

E' verosimile che non in tutti i tessuti le cellule germinative trovino il terreno adatto allo sviluppo e quindi vengano in parte distrutte. Ciò si verifica ad es. nel tessuto muscolare del piede (fig. 2), in cui abbiamo riscontrato inclusioni circoscritte di elementi parassitari in via di degenerazione. In numerosi altri organi, invece, le cellule germinative trovano la possibilità di svilupparsi fino a maturazione completa. Questi particolari che non ci risultano descritti da altri AA., sono dimostrati ampiamente dalle

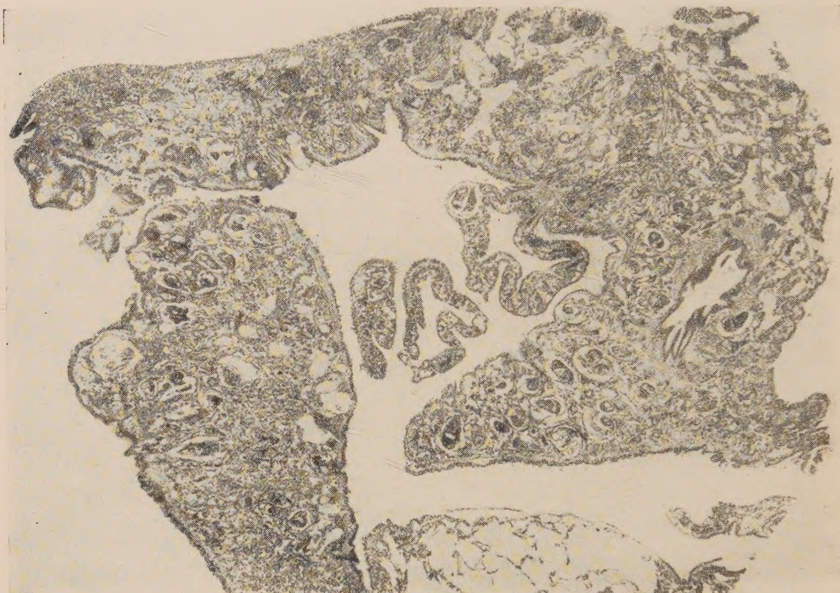


FIG. 4. — Sezione di polmone di mollusco parassitato, in 80ª giornata dall'infestazione.

Sulle pieghe del mantello delimitanti la camera polmonare si notano numerose cisti contenenti cercarie mature e presentanti le stesse caratteristiche già descritte per le cisti contenute nell'epatopancreas. Due cisti si notano anche nello spessore della membrana polmonare, interessate parzialmente nel taglio. In una delle cisti si nota una furcocercaria ripiegata su se stessa, interessata in tutta la sua lunghezza. (Obb. 3, Oc. 0, diam. 45).

unite microfotografie nelle quali sono riprodotte sezioni di alcuni organi intensamente parassitati, con presenza di furcocercarie assolutamente mature (polmone, ghiandola dell'albume, frangie del mantello, ecc.) (figg. 4, 5, 6).

Indubbiamente l'epato-pancreas del mollusco costituisce l'ambiente più adatto allo sviluppo delle cisti figlie, che si riscontrano ivi particolarmente numerose e che possono giungere ad infarcire completamente l'organo (fig. 8).

La prevalente localizzazione e sviluppo degli elementi parassitari nell'epato-pancreas deve inoltre rispondere ad un ben determinato fine, che è

quello della liberazione delle cercarie giunte a maturazione. Infatti è probabile che le cisti figlie, situate negli spazi interlobulari, facciano deiscenza nei canali biliari ed attraverso il condotto biliare pervengano nell'intestino e siano quindi espulse dal mollusco con le feci. Nelle nostre sezioni in serie non ci è mai occorso di notare lesioni di continuo del mantello in particolare nella ripiegatura esistente fra il corpo ed il margine del guscio, in

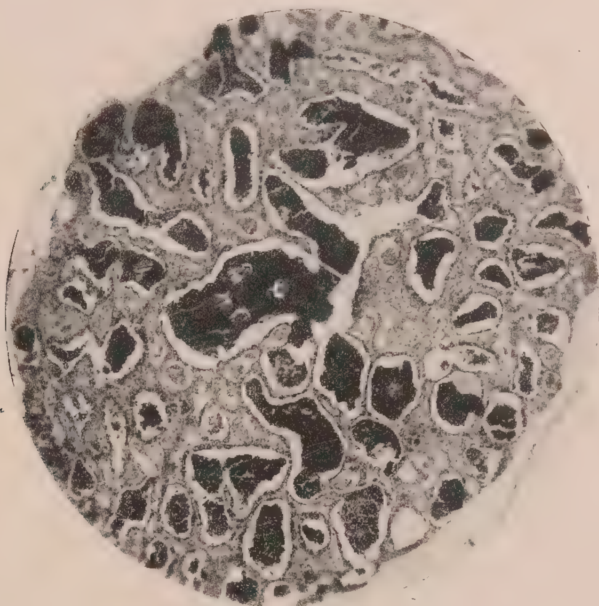


Fig. 5. — Sezione di ghiandola dell'albume di *Bulinus* in 80ª giornata dall'infestazione. Anche tale ghiandola è disseminata da cisti parassitarie. Le cercarie pur avendo raggiunta la maturità restano incluse nel tessuto della ghiandola che non possono abbandonare, data la particolare costituzione anatomica dell'organo. (Obb. 3, Oc. 0, diam. 45).

molluschi tenuti in osservazione per lungo tempo dal momento in cui cominciavano ad emettere furcocercarie.

Invece abbiamo potuto notare come l'epato-pancreas andava gradualmente svuotandosi del suo contenuto parassitario, espulso il quale, residuavano nell'organo ampie lacune, limitate dal tessuto di sostegno perilobulare, e con distruzione quasi totale del parenchima (fig. 9).

Negli stessi molluschi, giunti a morte, in cui si osservò una pressochè completa emissione delle furcocercarie dall'epato-pancreas, abbiamo potuto constatare che il contenuto parassitario degli altri organi rimaneva inalterato ed in sito anche a completa maturazione delle furcocercarie. Ciò ci induce a ritenere verosimile l'ipotesi che, così come l'infestazione del mollusco da parte dei miracidi si compie attraverso l'apertura orale ed il canale

digerente, anche l'emissione delle furcocercarie avvenga attraverso il canale intestinale e l'apertura anale.

Descritte in linea generale le modalità della moltiplicazione partenogenetica di *S. haem.* nel mollusco, documentate le nostre asserzioni con ripetuti esami anatomo-istologici, desideriamo soffermarci su alcuni dettagli riguardanti le particolari caratteristiche biologiche del parassita.

E' opinione che l'infestazione del mollusco da parte di miracidi determini un precoce stato immunitario, per cui l'evoluzione di un miracidio in

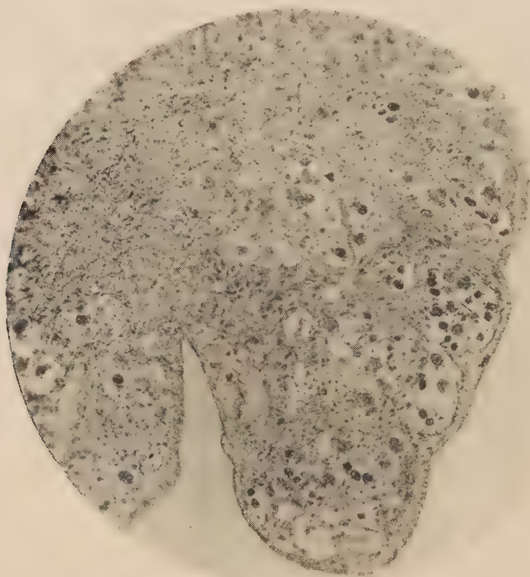


Fig. 6. — Sezione del mantello di un mollusco in 35ª giornata dall'infestazione sperimentale.

Nelle frangie del mantello si nota la presenza di numerose cisti, spesso raggruppate, tali da far pensare alle cosidette sporocisti degli AA., contenenti numerose cercarie immature. Anche tali larve, giunte a maturazione, rimarranno imprigionate nel tessuto connettivo muscolare del mantello del piede, attraverso il quale non potranno farsi strada per raggiungere l'esterno. (Obb. 3, Oc. 0, diam. 45).

sporocisti renderebbe impossibile lo sviluppo di altri miracidi infestanti contemporaneamente o successivamente il mollusco stesso.

Brumpt (3) crede di poter appoggiare tale ipotesi per il fatto che parassitando animali da esperimento (topi) con cercarie di trematodi a sesso distinto nello stadio adulto, quali sono appunto gli schisostomi (ad es. con *S. haematobium, S. mansoni, S. bovis* e *Bilharziella polonica*), provenienti da un solo mollusco, si otterrebbero infestazioni con vermi di un solo sesso, in quanto provenienti da un solo miracidio, il solo che si sarebbe potuto

sviluppare e nel quale quindi evolverebbero larve che, raggiungendo lo stadio adulto, sarebbero tutte di un solo sesso.

Le nostre osservazioni dimostrano invece la possibilità della contemporanea persistenza e sviluppo di più miracidi infestanti il mollusco, non solo nel medesimo tempo, ma anche a distanza di giorni. Infatti in alcuni *Bulinus* esposti a gettate infestanti per 3 giorni successivi, ed uccisi in 4ª-6ª giornata dall'infestione, si potè dimostrare la presenza di più sporoci-

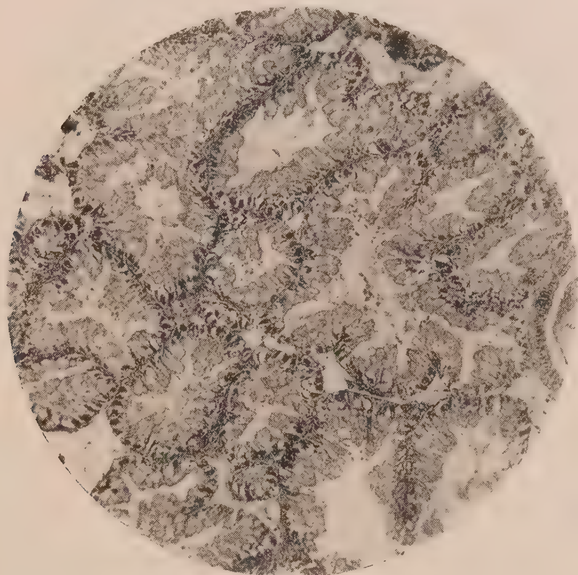


FIG. 7. — Sezione di ghiandola epatica di *Bulinus* normale. E' ben visibile la struttura di un lobo dell'organo, a sua volta suddiviso in lobuli. La capsula che riveste la ghiandola invia sottili propaggini fra i lobi ed i lobuli, costituendo la trama di sostegno. Tra un lobulo e l'altro esistono degli spazi lacunari che confluiscono verso i canalicoli biliari di ogni lobo.

Nei lobuli, di aspetto irregolarmente rotondeggiante, ovoidale o poligonale, le cellule sono disposte in serie unica, a palizzata. Le cellule epatiche sono piuttosto grandi, con protoplasma ampio rivolto verso il centro del lobulo e col nucleo situato verso il polo d'impianto della cellula alla periferia. Le cellule così disposte delimitano al centro del lobulo delle lacune. (Obb. 3, Oc. 0, diam. 45).

sti in diversi gradi di sviluppo, grandi ed irregolari alcune (miracidi della prima gettata infestante), ancora piccole e conservanti talvolta la configurazione del miracidio altre (miracidi delle ultime gettate infestanti), ma tutte egualmente attive (fig. 1).

Le proprietà immunizzanti del mollusco alla reinfestazione da parte dei miracidi non sono quindi confermate dalle nostre esperienze. La possibilità di infestare gli animali da esperimento con vermi adulti di un solo sesso, secondo BRUMPT, è probabilmente dovuto al fatto che i molluschi

da cui provenivano le cercarie avevano in effetti subito l'infestazione casuale di un solo miracidio anzichè di molti.

Indirettamente tali considerazioni hanno importanza nei riguardi della patologia umana. E' noto come qualche Autore voglia riferire ad un'infestazione da soli vermi maschi sindromi pseudo-bantiane frequenti nei fel-

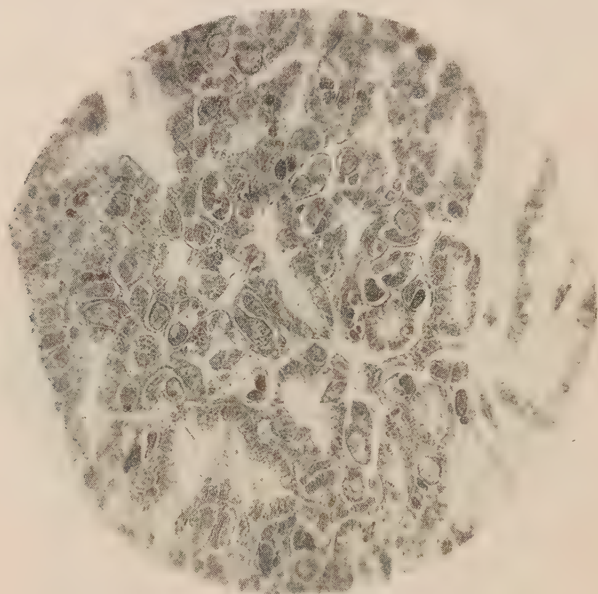


FIG. 8. — Sezione di epatopancreas di mollusco parassitato, in 65ª giornata dall'infestazione sperimentale.

La struttura della ghiandola epatica è completamente sovvertita; l'organo è infarcito di cisti secondarie, in cui le cercarie sono giunte a maturazione quasi completa. Si noti la sede delle cisti che occupano gli spazi lacunari extralobulari. I lobuli epatici, sotto l'azione tossica e meccanica esercitata dai parassiti, hanno perso il loro normale disegno e sono in gran parte scomparsi. I lobuli rimasti presentano segni di evidente disorganizzazione con discontinuità alla periferia, e degenerazione delle cellule, che si presentano ridotte di volume, con protoplasma retratto e torbido e nuclei picnotici e mal colorabili. Le lacune centrali sono ampie e comunicano spesso con gli spazi extralobulari, attraverso le discontinuità cellulari e le soluzioni di continuo della membrana perilobulare di sostegno.

Le inclusioni parassitarie infarciscono gli spazi triangolari alla periferia del lobulo e sono costituite da numerose piccole cisti composte di una capsula contenente le larve in via di maturazione.

Al centro della figura si nota una cisti in cui le cercarie sono state interessate dal taglio pressochè per intero nella loro lunghezza. (Obb. 3, Oc. 0, diam. 45).

lahs dell'Egitto (la cosidetta splenomegalia egiziana) che, chiare nella loro eziologia quando vi è il reperto delle uova di schistosomi nelle urine o nelle feci (forme vescicale od intestinale da *S. haem.* o da *S. mansoni*), sembrano di oscura patogenesi quando tale reperto manchi. La epatosple-

nomegalia egiziana si ritiene dovuta alle sostanze tossiche elaborate dai vermi, tossicosi (frequente nelle forme da *S. mansoni* e, in Estremo Oriente, da *S. japonicum*), che si ha anche nell'infestazione da soli vermi maschi. Però, come lo stesso Brumpt (3) ha provato per alcuni animali da esperimento, l'infestazione con vermi di solo sesso maschile sembra piuttosto ascrivibile a particolari reazioni immunitarie dell'organismo ospite definitivo del parassita, più spiccate ed elettive per i parassiti di sesso femmi-

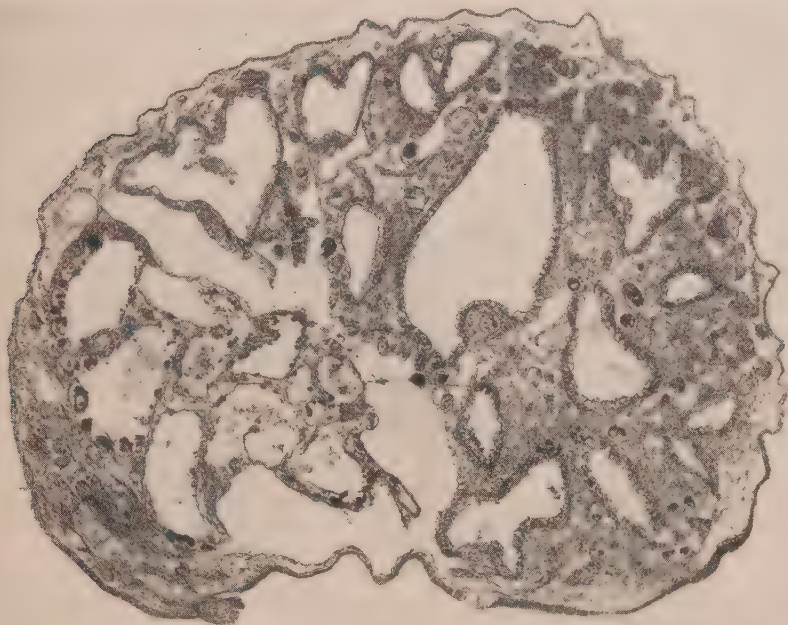


Fig. 9. — Sezione di epatopancreas di mollusco in 80° giornata dalla infestazione. Il disegno lobulare è irriconoscibile. Gran parte delle cercarie mature hanno abbandonato l'organo. Ampie lacune residuano là dove il parenchima è stato distrutto e nei vuoi lasciati dalle larve. (Obb. 3, Oc. 0, diam. 45).

nile. Quindi il reperto di soli schistosomi maschi è dovuto, caso mai, a particolari reazioni biologiche dell'organismo superiore, ospite definitivo e non all'infestazione massiva di questo da parte di cercarie provenienti da un solo mollusco e tutte di un solo sesso, per un processo immunitario creatosi nel mollusco stesso, che permetterebbe l'evoluzione ad un solo miracidio, da cui le cercarie stesse trarrebbero origine.

L'inesistenza di fenomeni immunitari da parte dei molluschi nei riguardi della multipla e successiva infestazione ad opera dei miracidi è

(8) Palombi A.: *Riv. Parassitol.*, 6, 1942.

provata da un importante lavoro di Palombi (9) sul ciclo biologico di *Ptychogonimus megastoma* (Rud), ciclo che, nello stadio di moltiplicazione partenogenetica, diversifica notevolmente da quello comunemente noto per i Trematodi dell'uomo e degli animali terrestri. *Ptychogonimus megastoma* è un trematode, parassita allo stato adulto di un selaceo squaloideo, appartenente ai generi *Prionace, Mustelus, Galeus, Scyllorhinus,* il cui ciclo larvale si svolge attraverso due ospiti intermedi: un mollusco scafopodo del genere *Dentalium* ed un crostaceo brachiuro, per lo più del genere *Portunus.*

I miracidi di megastoma, che si liberano dalle uova deposte sul fondo marino dal selaceo, infestando il mollusco ospite intermedio, dànno origine ad una sola sporocisti, nella quale si sviluppano fino a maturazione le cercarie. Orbene il numero delle sporocisti varia sensibilmente e ne sono state contate in più esemplari di *Dentalium* da 10 a 74 in diverso grado di sviluppo. Ciò attesta che l'infestazione del mollusco da parte del miracidio è multipla e ripetuta e, come afferma l'A., si manifesta durante tutto l'anno e dura per tutta la vita del mollusco. Non si risveglia cioè in esso alcun fenomeno immunitario nel succedersi delle infestazioni.

Nei riguardi delle sporocisti primarie abbiamo già accennato al loro aspetto anatomico; esse sono costituite da una membrana sacciforme contenente una grande quantità di cellule germinative. All'intorno della membrana propria della sporocisti si forma una seconda membrana di reazione, generata dai tessuti dell'ospite, alquanto spessa, costituita di connettivo collageno (fig. 10, dettaglio della fig. 1). In sostanza il miracidio, raggiunto il tessuto periesofageo del mollusco perde rapidamente gli organi locomotori (cilia) e perforatori (rostro e ghiandole cefaliche, secernenti queste sostanze litiche), nonchè gli organi deputati alla vita vegetativa, durante il breve periodo di vita libera (stomaco, fiamme vibratili e canalicoli escretori), conservando l'involucro che per osmosi provvede al ricambio delle cellule germinative, in fase di rapida motiplicazione. Come abbiamo anche detto, le cellule germinative si moltiplicano, a nostro giudizio, per successiva suddivisione di quelle già esistenti e non per produzione di esse da uno o più centri germinativi, di cui non ci è stato possibile dimostrare la esistenza, neppure su sezioni in serie interessanti l'intera sporocisti.

Le cisti figlie di *S. haem.*, che originano dalle cellule germinative, disseminate nei vari organi del mollusco dopo la rottura della sporocisti madre si discostano alquanto da quelle fino ad oggi descritte, ed è per questo che noi preferiamo chiamarle cisti anzichè sporocisti.

Esse sui preparati in sezione appaiono costituite da una membrana anista (parete della cisti) contenente in genere 2 elementi parassitari, come se da ogni cellula germinativa, per un solo processo di suddivisione,

originassero due furcocercarie. Infatti, a maturazione raggiunta, in ogni sporocisti si notano due furcocercarie diversamente orientate fra di loro.

Quindi non grandi sporocisti figlie, a sviluppo progressivo con prolungamenti sacciformi; non centri germinativi, con produzione di cercarie in serie, ma elementi molto semplici, composti di una membrana cistica e di due larve evolventi contemporaneamente a maturazione. Ciò che rende ancor più verosimile l'ipotesi della loro origine metastatica ad opera delle primitive cellule germinative.

Talvolta alcune cisti sembrano contenere, nei preparati in sezione, più di due furcocercarie; ciò è dovuto al fatto che spesso le cellule germinative metastatizzano in gruppo e si trovano così ravvicinate durante lo sviluppo

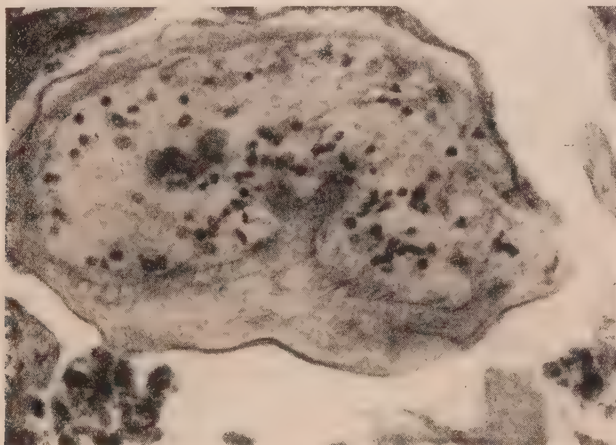


FIG. 10. — Particolare della fig. 1. Sporocisti primaria di 3 giorni. Essa conserva ancora morfologicamente l'aspetto del miracidio da cui origina, leggermente flesso sul lato destro (per chi osserva). Sono sopratutto evidenti le cilia che rivestono la cuticola ed il bottone cefalico (rostro). Gli organi interni sono scomparsi e le cellule germinative riempiono tutta la cavità corporea. (Obb. 1/7, Oc. 8 comp., diam. 400).

da costituire un agglomerato, limitato nell'insieme dai tessuti dell'ospite. Tuttavia, anche in tale caso, è possibile distinguere diverse concamerazioni dovute alle membrane delimitanti le singole cisti. Se le cisti figlie fossero costituite da un corpo centrale dal quale si dipartissero prolungamenti sacciformi, sulle sezioni in serie da noi praticate il taglio avrebbe dovuto qualche volta interessare il nucleo centrale della sporocisti e qualche prolungamento nella sua lunghezza, il che non ci è mai occorso.

Notiamo incidentalmente che le nostre microfotografie riguardanti le cisti figlie sono quanto mai simili a quelle riportate da HIGUCHI (9) per

(9) HIGUCHI R.: *The Parasitology Laboratory*, Tokyo, *12*, 1289, 1938.

Clonorchis sinensis, in uno dei pochissimi lavori veramente dimostrativi e documentati sullo stadio di moltiplicazione partenogenetica di un Trematode, negli organi del mollusco ospite intermedio (nel caso particolare in *Bithynia*). Ricordando quanto abbiamo già scritto precedentemente nei riguardi della via di infestazione del mollusco da parte del miracidio, dobbiamo ritenere che i processi di riproduzione partenogenetica siano quanto mai simili nei due generi di trematodi.

Tale tipo di cisti si discosta notevolmente dalle sporocisti (nel vero senso della parola) di innumerevoli altri trematodi.

Le precedenti versioni sul ciclo biologico di *S. haem.*, dedotte in parte ipoteticamente sulla falsa riga del ciclo larvale dei trematodi in genere. incorrono spesso, ove si scenda nei particolari, in notevoli inesattezze. Noi riteniamo con le nostre ricerche, basate su prove sperimentali più volte ripetute e documentate da esami anatomo istologici, di aver portato un contributo alla conoscenza del ciclo larvale di tale trematode, specie nella fase di difficile studio ed interpretazione quale è quella della moltiplicazione partenogenetica nel mollusco ospite intermedio.

RIASSUNTO

L'A. studia il ciclo biologico di *Schistosoma haematobium* nella fase della moltiplicazione partenogenetica, infestando sperimentalmente numerosi molluschi del genere *Bulinus* e *Physopsis*. Si intrattiene particolarmente sulla modalità di infestazione del mollusco da parte del miracidio, sullo sviluppo della sporocisti primaria (o madre), sul meccanismo di diffusione degli elementi parassitari dalla sporocisti derivati nei vari organi del mollusco, sulla maturazione delle furcocercarie nelle cisti secondarie (o figlie).

Dimostra l'inesistenza di fenomeni immunitari nel mollusco ospite intermedio, tali da inibire la multipla e ripetuta infestazione e sviluppo da parte di più di un miracidio.

Illustra le argomentazioni con numerose microfotografie originali di cui non esiste documentazione nella letteratura.

RÉSUMÉ

L'A. étudie le cycle biologique de *Schistosoma haematobium* dans la phase de la multiplication parthénogénétique en infestant expérimentalement de nombreaux mollusques du genre *Bulinus* et *Physopsis*. Il insiste particulièrement sur la modalité d'infestation du mollusque de la part du miracidium, sur le développement du sporocyste primaire, sur le mécanisme de diffusion des éléments parasitaires dérivés du sporocyste dans les différents organes du mollusque, sur la maturation des furcocercaires dans les cystes secondaires (ou fils).

Il démontre l'inexistence de phénomènes immunitaires dans le mollusque, hôte intermédiaire, qui seraient capables d'inhiber l'infestation multiple et répétée et le développement de plus d'un miracidium.

Ces arguments sont illustrés par de nombreuses microphotographies originales dont il n'exite pas de documentation dans la littérature médicale.

SUMMARY

The Author studies the life cycle of *Schistosoma haematobium* in its phase of parthenogenenetic multiplication, experimentally infesting number of mollusca of the genus *Bulinus* and *Physopsis*. The ways of the mollusc infestation by the miracidium are particularly stressed as well as the development of the first generation's sporocist, the mechanism of diffusion of the parasitary elements from the sporocyst into the various mollusc's organs and the developing of the furcocercaries into second generation's cysts (or daughters).

Immunitary phenomena in the mollusc, intermediary host, capable of inhibiting the manyfold and reiterated infestation and the development of more than one miracidium, are shown to be inexistent.

The Author illustrates his views with number of original photomicrographs of which there is no documentation in medical literature.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA TOXOPLASMOSI E CONSIDERAZIONI SULLE DIVERSE SPECIE CHE COSTITUISCONO IL GENERE *TOXOPLASMA*

Dott. ANTONIO SPENA

Istituto Vaccinogeno Zooprofilattico di Addis Abeba
Direttore inc.: Dr. B. Chiari

Tra i protozoi che non hanno una posizione sistematica ben definita meritano particolare attenzione, per i processi morbosi ancora non molto chiari cui possono dar luogo, i parassiti oggi comunemente inclusi nel genere *Toxoplasma* rinvenuti nelle cavità splancniche, nelle cellule endoteliali e nei leucociti di vari vertebrati.

Il primo di questi microrganismi ad essere scoperto fu il *Toxopasma gondi* trovato da Nicolle e Marceaux nel 1908 nel Gondi (*Ctenodactylus gundi*) nell'Africa del Nord.

Nello stesso tempo Splendore, nel Brasile, dava il nome di *Toxoplasma cuniculi* ai parassiti rinvenuti nel coniglio, che, come il *Toxoplasma gondi* era facilmente inoculabile ai cani ed ai piccioni.

De Mello (1910), a Torino, scopriva un cane naturalmente infetto di *Toxoplasma* e Prowazeck nello stesso anno menzionava un *Toxoplasma talpoe* in una talpa giapponese.

Yakimoff e Kohl-Yakimoff (1911), in Germania, descrissero una manifestazione analoga a quella descritta da De Mello, mentre Carini (1911), nel Brasile, menzionò una Toxoplasmosi naturale in un cane ed in un piccione che attribuì al *Toxoplasma cuniculi*, perchè il parassita del coniglio, scoperto da Splendore, era facilmente inoculabile ai cani ed ai piccioni.

Bourret (1911), nel Senegal, trovò un coniglio naturalmente infetto e Sangiorgi (1913 e 1914) descrisse un *Toxoplasma musculi* nel topo (*Mus musculi*) ed un *Toxoplasma ratti* nel ratto (*Rattus rattus*).

Anche il parassita descritto da Todd e Wolbach (1912) nell'avvoltoio

della Gambia (*Neophron monachus*) come *Leoucytogregarina neophrontis* è pure un *Toxoplasma* (Wenyon).

Marullaz (1913) accertò che il parassita visto da Laveran, nel 1900, nel passero di Giava (*Munia oryzivora*), apparteneva al genere *Toxoplasma* e ad esso ascrisse i vari parassiti descritti da Aragão (1911), nel Brasile, come Emogregarini degli uccelli, proponendo di chiamarli con l'unico nome di *Toxoplasma avium*. Ma avendo Aragão descritto questo parassita col nome di *Haemogregarina paddoe*, per ragioni di priorità, si è convenuto di chiamarlo col nome di *Toxoplasma paddoe*.

Anche il parassita visto da Adie (1908) nel passero indiano e l'altro parassita trovato da Novy e Mc. Neal (1904) nel passero americano (descritto da quest'ultimi ricercatori col nome di *Haemoproteus rouxei*) sono pure dei *Toxoplasmi* (Wenyon).

Castellani (1913), nella milza di uomo morto in India di un irregolare tipo di febbre associata a splenomegalia, osservò un parassita appartenente al genere *Toxoplasma*, cui diede il nome di *Toxoplasma pyrogenes*.

Laveran e Marullaz (1914) descrissero il *Toxoplasma liothricis* nell'uccello giapponese (*Liothrix luteus*) e De Mello, nel 1915, col nome di *Haemogregarina francoe*, descritte il Toxoplasma del piccione indiano.

Carini e Migliano (1916) danno il nome di *Toxoplasma caviae* ad un Toxoplasma rinvenuto nelle cavie nelle quali avevano determinato la Toxoplasmosi spontanea.

Federovitch, nel sangue di un ragazzo delle rive del Mar Nero, osservò lo stesso microrganismo visto da Castellani. Ed. e Et. Sergent e Parrot sostennero che, il parassita di Federovitch, fosse una Emogregarina vicina ad *Haemogregarina elliptiaa*. Anche Chalmer e Kamar (1920), nel Sudan, menzionarono una manifestazione simile a quella descritta da Castellani, interessante la milza di un uomo venuto a morte per splenomegalia.

Plimmer (1916), nel Giardino Zoologico di Londra rinvenne e descrisse i Toxoplasmi: nella *Crytoprocta ferox* (piccolo mammifero del Madagascar), in due uccelli (il *Carpophaga concinna* delle Isole Aru ed il *Pratincola caprata* dell'India) ed in un serpe (*Coluber melanoleucus*) del Messico.

Mesnil, nel 1918, espresse l'opinione che in natura esiste una sola specie di Toxoplasma suscettibile di parassitare ospiti appartenenti a specie zoologiche diverse.

Boez (1921) a Strasburgo formulava il reperto di Toxoplasma nel cane e Walzeberg, nel 1923, descriveva una Toxoplasmosi del verdone in Germania.

Brug, den Heyer e Haga (1925) osservarono una epizoozia tra i conigli delle Indie Olandesi dovuta all'infezione da Toxoplasma.

De La Barbera e Riva (1927) rinvengono nelle cavie il *Toxoplasma caviae* nel corso delle esperienze sul tifo esantematico.

Nicolau (1932) osservò il *Toxoplasma caviae* all'Istituto Pasteur di Parigi durante i passaggi di un ceppo di virus rabbico nelle cavie

Nicolau e Kopcioska (1935) studiano l'infezione sperimentale da *Toxoplasma canis* nei piccoli uccelli e pervengono alle conclusioni espresse da Mensil della unicità delle specie di Toxoplasma create.

Boisseau e Nodenot (1936) all'Istituto Pasteur di Brazzaville (A.E.F.) riscontrando il *Toxoplasma caviae* in cavie inoculate con un ceppo di *Trypanosoma gambiense*, affermano la possibilità della diffusione spontanea del Toxoplasma per via digerente e ritengono le varie specie di Toxoplasma descritte come una unica specie.

De Fano (1924), nel parassita rinvenuto nell'encefalo di un coniglio, individuò l'*Encephalitozoon cuniculi*. Ma Wolf e Cowen (1937), basandosi sul reperto di De Fano, dopo avere descritto un caso umano in un bambino morto quattro settimane dopo la nascita (che all'autopsia svelò lesioni infiammatorie disseminate nel cervello, nel midollo osseo, nella retina e nella coroide di tutti e due gli occhi), lo attribuirono all'*Encephalitozoon cuniculi*, per la somiglianza che, le lesioni riscontrate, avevano con quelle descritte da De Fano. Più tardi, nel 1938, gli stessi autori, dopo avere ammesso che l'identificazione tra l'*Encephalitozoon* ed il *Toxoplasma*, dei microrganismi rinvenuti nel 1937, non era stata effettuata, conclusero esprimendo la convinzione che tali parassiti fossero dei Toxoplasmi e non degli Encephalitozoon.

Kopcioska e Nicolau (1938) trovarono nell'encefalo di uno scimpanzè una cisti ripiena di Toxoplasmi. L'assenza della reazione infiammatoria fece pensare a questi autori che l'infezione, di antica data, fosse stata contratta, probabilmente, presso l'Istituto Pasteur, dove l'animale aveva soggiornato quattro anni.

Wolf, Cowen e Paige (1940) rinvenendo un Toxoplasma negli animali da esperimento (conigli e topi), infettati con cervello e midollo spinale di un ragazzo encefalitico, crearono una nuova specie di Toxoplasma (*Tox. hominis*).

Ricerche di Levaditi ed altri Autori hanno dimostrato che è possibile ottenere in diverse specie animali, inoculati sperimentalmente con *Toxoplasma cuniculi*, delle alterazioni acute e croniche nel nevrasse (encefalomielite da Toxoplasma). Secondo Franchini e Giordano queste lesioni potrebbero spiegare l'eziologia ancora oscura di alcune malattie nervose umane come: l'idrocefalo congenito e l'amaurosi familiare.

Marganiros Torres ha descritto il caso di un neonato che presentava contratture muscolari generalizzate e convulsioni, seguite da morte due gior-

ni dopo dalla nascita. L'esame istologico rivelò note di intensa encefalite e la presenza, nell'encefalo, di noduli contenenti parassiti intracellulari, molto simili ai Toxoplasmi. Tali parassiti da TORRES vennero classificati col nome di *Encephalitozoon chagasi*.

JANKU ha pure descritto il caso di un neonato affetto da idrocefalo e coloboma della Macula lutea. L'esame istologico del globo oculare mostrò la presenza di formazioni di natura parassitaria i cui caratteri morfologici, però, potevano ravvicinarsi sia al *Toxoplasma* che all'*Encephalitozoon cuniculi* (FRANCHINI e GIORDANO).

Infezioni da Toxoplasma negli uccelli sono state descritte da MANUEL e HERMANN (1935), da HERMANN (1937), da WOLFSON (1937), da TADDIA (1937), da RAFFAELE (1932-1938), ecc., malgrado alcuni autori identifichino detti reperti con i corpi Toxoplasma-simili, osservati nelle infezioni da plasmodi aviari. GIOVANNOLA (1938) afferma che nessuna trasmissione di Toxoplasma aviario è stata finora ottenuta senza una contemporanea infezione da plasmodi e che le infezioni da Toxoplasma degli uccelli non corrispondono alle descrizioni dei Toxoplasmi dei mammiferi, i quali, a differenza dei Toxoplasmi aviari, si trasmettono facilmente da un animale all'altro mediante la inoculazione di emulsione di organi parassitati; egli formula l'ipotesi che le infezioni da Toxoplasma osservate negli uccelli, possano rappresentare stadi di sviluppo exo-eritrocitici dei plasmodi aviari.

Appaiono dunque ancora confuse le conoscenze su questo ramo della Protozoologia, in cui dibattuti e non confermati sono i vari reperti di Toxoplasma; in molti casi è persino dubbio se i microrganismi descritti come Toxoplasmi, siano realmente di questa natura. Nulla, infatti, è stato ancora dimostrato per una sistematica di questi parassiti, non si conosce il loro ciclo di evoluzione, sia nell'ospite definitivo che in un eventuale ospite intermedio, nè si conoscono tutti i vertebrati più o meno recettivi.

Altrettanto confuse sono infine le forme cliniche ed i quadri anatomo-patologici che la Toxoplasmosi può determinare nell'uomo e negli animali.

RICERCHE PERSONALI

Nel gennaio 1940, all'Istituto per la Profilassi e lo Studio delle Rickettsiosi di Addis Abeba vennero osservati alcuni casi di Toxoplasmosi spontanea delle cavie da esperimento allevate (1).

Per gentile concessione del Direttore di quell'Istituto Prof. Mariani, potei avere il ceppo parassitario e con esso studiare il Toxoplasma e la malat-

(1) Su questi casi di Toxoplasmosi e sul Toxoplasma osservato ha già riferito Mariani (*Riv. di Biol. Coloniale*, vol. IV, fasc. I-II, aprile 1941).

tia che determinava. Iniziai così una serie di ricerche sperimentali, allo scopo di portare un modesto contributo alla conoscenza di questa infezione.

Col materiale raccolto dagli organi interni (fegato, milza, rene, cervello, ecc.) delle cavie n. 236 e n. 237, venute a morte di Toxoplasmosi il 4 febbraio 1940, presso il detto Istituto, procedetti ad inoculazioni sperimentali di cavie sane. Successivamente, col materiale di una di queste cavie, morta di Toxoplasmosi sperimentale, venne inoculato un vitello ed un coniglio. Il vitello a sua volta, allorchè venne a morte, fornì il materiale infettante per inoculare altri due vitelli, un secondo coniglio e due cavie.

Tutti questi animali furono rigorosamente scelti tra gli animali da esperimento dell'allevamento del nostro Istituto che all'osservazione clinica ed agli esami microscopici del sangue e delle feci, dei giorni antecedenti le inoculazioni sperimentali, non misero in evidenza alterazioni degne di rilievo.

Le inoculazioni del materiale infettante vennero, in tutti gli animali trattati, effettuate per via endoperitoneale, con emulsione di organi di animali morti di Toxoplasmosi, spappolati in mortaio con soluzione fisiologica sterile.

Il materiale infettante delle cavie n. 236 e n. 237, venne tenuto in ghiacciaia dal 4 al 6 febbraio, giorno in cui poterono essere inoculate le prime otto cavie.

Le inoculazioni degli altri animali da esperimento vennero, invece, eseguite alcune ore dopo la morte dell'animale che forniva il materiale infettante.

Il prelevamento, lo spappolamento, nonchè la pratica delle inoculazioni infettanti vennero effettuati nelle più rigorose condizioni di asepsi.

Tutti gli animali inoculati vennero tenuti in rigorosa osservazione clinica, con esplorazioni termometriche mattutine e serali. Si procedette pure ad esami microscopici giornalieri del sangue e delle feci (2), per come risulta dai protocolli seguenti:

Cavia n. 1. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 236: 1/10 di cc. di emulsione di gr. 2 di fegato e milza (fegato gr. 1; milza gr. 1) spappolati in mortaio con 20 cc. di soluzione fisiologica.

La curva termica, se, nei giorni seguenti l'inoculazione sperimentale ebbe degli abbassamenti sensibili (sotto i 37°C.), dopo il 13 febbraio si normalizzò. Il 3 e 6 marzo si registrarono temperature di 36°,7 e 36°,2, ma nei giorni successivi la curva termica si stabilizzò tra 37°,5 e 38°,5.

(2) I preparati di sangue vennero sempre colorati con metodo di Giemsa. Gli esami delle feci vennero effettuati macroscopicamente e microscopicamente a fresco, con colorazione jodica e col metodo di Teleman.

Dopo il 23 marzo, salvo qualche rarissima deviazione, fino al luglio 1940, la temperatura si mantenne sempre normale.

Solo nei primi giorni, dopo l'inoculazione sperimentale, l'animale manifestò disturbi lievi, come abbattimento e svogliatezza.

Successivamente, fino al luglio 1940, non manifestò alterazioni di sorta.

Gli esami microscopici del sangue e delle feci, eseguiti costantemente, risultarono sempre negativi.

Cavia n. 2. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 236: 1 cc. di emulsione di gr. 2 di cervello spappolato in mortaio con 20 cc. di soluzione fisiologica.

Tre giorni dopo l'inoculazione sperimentale la temperatura cominciò ad avere deviazioni sensibili ed il giorno 12 si registrò un abbassamento termico a 36°,2, mentre l'animale manifestava: inappetenza, svogliatezza, abbattimento grave e turbe nervose. Alle ore 12 del 13 febbraio 1940, la cavia venne a morte in preda a grande abbattimento.

Gli esami microscopici del sangue periferico rivelarono raramente, nel plasma, nei leucociti e nelle cellule endoteliali circolanti, la presenza di microelementi riferibili al genere Toxoplasma. Qualitativamente, il sangue mai mise in evidenza alterazioni degne di rilievo.

Gli esami microscopici delle feci mai svelarono alterazioni di sorta.

Alla necroscopia dell'animale fu riscontrato: peritoneo congesto ed infiammato con presenza di abbondante essudato di colore giallo-citrino nel cavo peritoneale, milza congesta ed aumentata di volume, reni congesti e degenerati, ghiandole linfatiche ipertrofiche e succose, fegato lievemente congesto ed aumentato di volume, pleure leggermente infiammate, pericardio arrossato e congesto con presenza di discreta quantità di essudato di colore giallo-citrino nel cavo pericardico, miocardio degenerato, meningi ispessite, cervello con fatti di rammollimento e stravasi cerebrali. Null'altro venne rilevato a carico degli altri organi interni, del sistema muscolare e dei comuni tegumenti.

Gli esami degli strisci del sangue, del cuore, del fegato, della milza, dei reni, delle ghiandole linfatiche, del cervello e del midollo spinale, come pure gli esami microscopici del materiale prelevato e dal peritoneo e dal pericardio (per lieve raschiamento), svelarono la presenza di microrganismi che per forma e dimensioni erano riferibili al genere Toxoplasma. Gli strisci degli altri organi interni risultarono negativi, come pure negativi risultarono gli esami microscopici del contenuto intestinale. Le prove culturali eseguite con materiale prelevato dai vari organi interni, risultarono negative per i comuni germi patogeni.

I protocolli delle cavie seguenti vengono riportati in sunto perchè gli esami clinici, anatomo-patologici e di laboratorio, di questi animali (salvo

piccole varianti non degne di rilievo) diedero referti analoghi a quelli descritti per le cavie nn. 1 e 2.

Cavia n. 3. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 236: 1/10 di cc. di emulsione di gr. 2 di fegato e milza (fegato gr. 1, milza gr. 1) spappolati in mortaio con 10 cc. di sol. fisiologica.

Improvvisamente, il 13 febbraio 1940, mostrò sintomi gravi di malattia e venne a morte alle ore 23 dello stesso giorno

Cavia n. 4. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 236: 1 cc. di emulsione di gr. 1 di cervello spappolato in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

Mostrò lievi disturbi con oscillazioni termiche, talvolta sensibili, dalla seconda decade di febbraio ai primi giorni di marzo. Successivamente fino al luglio 1940, mai mostrò sintomi di malattia. Gli esami delle feci misero talvolta in evidenza rare oocisti di *Eimeria stiedae* (Coccidi).

Cavia n. 5. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materiale prelevato degli organi della cavia n. 237: 1/10 di cc. di emulsione di gr. 1 di fegato e gr. 1 di milza spappolati in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

Mostrò sintomi gravi di malattia dal 13 al 16 febbraio 1940. Nella notte successiva venne a morte.

Cavia n. 6. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materilae prelevato dagli organi della cavia n. 237: 1 cc. di emulsione di gr. 1 di fegato e gr. 1 di milza spappolati in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

Due giorni dopo l'inoculazione sperimentale, cominciò a mostrare sin-
Il materiale infettato delle cavie n. 236 e n.. 237, venne tenuto in ghiac-
tomi gravi di malattia. Venne a morte nella notte tra il 14 ed il 15 febbraio 1940.

Cavia n. 7. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 237: 1/10 di cc. di emulsione di gr. 1 di cervello spappolato in mortaio con 20 cc. di soluzione fisiologica.

Mostrò sintomi gravi di malattia negli ultimi quattro giorni in cui fu in vita. Venne a morte la mattina del 15 febbraio 1940.

Cavia n. 8. — Venne inoculata il 6 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 237: 1 cc. di emulsione di gr. 1 di cervello spappolato in mortaio con 20 cc. di soluzione fisiologica.

Mostrò lievi disturbi e la curva termica ebbe andamento piuttosto irregolare solo nella seconda quindicina di febbraio. Successivamente, fino al luglio 1940, mai mostrò sintomi di malattia.

Cavia n. 9. — Venne inoculata il 17 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 5: 1 cc. di emulsione di gr. 2 di cervello spappolato in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

Mostrò sintomi gravi di malattia dal 25 febbraio in poi. Venne a morte alle ore 22,30 del 4 marzo 1940.

Cavia n. 10. — Venne inoculata il 17 febbraio 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 5: 1/10 di cc. di emulsione di gr. 1 di fegato e gr. 1 di milza spappolati in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

Durante il mese di marzo mostrò sintomi talvolta gravi di malattia con oscillazioni termiche sensibili. Ma in aprile le sue condizioni generali migliorarono e fino al luglio 1940 non mostrò disturbi degni di rilievo.

Vitello n. 33. — Venne inoculato il 5 marzo 1940 con materiale prelevato dagli organi della cavia n. 9: 1 cc. di emulsione di gr. 2 di rene spappolato in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

La curva termica, salvo qualche raro innalzamento sopra i 39°C., ebbe andamento regolare fino al 20 marzo. Il giorno appresso la temperatura si abbassò improvvisamente a 36°,6, ma nei giorni successivi accennò ad innalzarsi sempre più sino a raggiungere i 41°C. il 25 marzo. Ma il 27 mattino, la temperatura si abbassò a 37°,2. Successivamente la curva termica mantenne andamento irregolare con oscillazioni talvolta sensibili. Si registrarono: un abbassamento a 36°,9 il 4 aprile, un innalzamento a 40°,4 il 7, un abbassamento a 36°,6 il 9 ed una temperatura di 36°,5 la mattina del 17 aprile. Il mattino del 18 aprile si registrò una temperatura di 36°,5. Nel pomeriggio dello stesso giorno l'animale venne a morte.

Il vitello che era in ottime condizioni di nutrizione, alcuni giorni dopo l'inoculazione sperimentale cominciò a dimagrare progressivamente, mostrando: inappetenza, svogliatezza, respiro accelerato, abbattimento e turbe nervose. Tali disturbi, in aprile, si fecero più marcati. Il 17 aprile le condizioni dell'animale erano gravissime e fino alla morte non fu capace di reggersi in piedi.

Gli esami microscopici del sangue, oltre ad anisocitosi poichilocitosi e policromatofilia, misero talvolta in evidenza, nei leucociti e nelle cellule endotoliali circolanti, rari microrganismi riferibili al genere *Toxoplasma*.

Gli esami microscopici delle feci furono sempre negativi.

Alla necroscopia il vitello presentò: stato di nutrizione molto scadente, mucose pallide. Nella cavità addominale: peritoneo arrossato e congesto, con presenza di discreta quantità di essudato di colore giallo-citrino nel cavo addominale, intestino quasi vuoto, milza congesta ed aumentata di volume, reni con emorraggie puntiformi, ghiandole linfatiche ipertrofiche, congeste e succose. Nella cavità toracica: pleure leggermente arrossate,

pericardio infiammato con presenza di piccole quantità di essudato di colore giallo-citrino nel sacco pericardico, cuore sfiancato con epicardio lievemente arrossato, miocardio degenerato. Nella cavità cranica: meningi ispessite, cervello con fatti di encefalite all'emisfero sinistro e stravasi sanguigni. Nessuna altra lesione venne notata a carico degli altri organi, del sistema muscolare e dei comuni tegumenti.

Gli esami degli strisci del fegato, della milza, dei reni, delle ghiandole

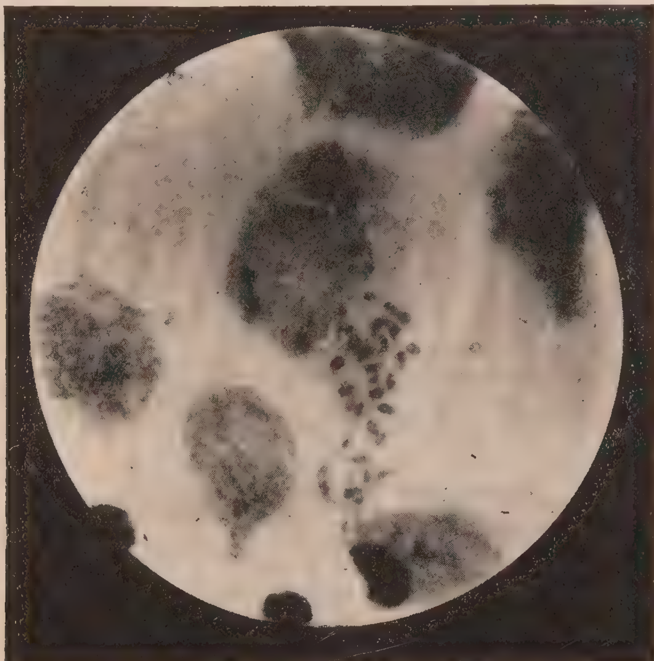


FIG. 1. — Vitello n. 33 - Cervello (striscio).
Cellula endoteliale con toxoplasmi situati sia in corrispondenza del nucleo che del citoplasma. I parassiti del citoplasma sembra siano stati fissati nel momento in cui stanno per lasciare la cellula.
(Ob. 100x, Oc. 6x).

linfatiche, come pure gli esami microscopici del materiale prelevato dal peritoneo, dalle pleure e dal pericardio, misero in evidenza parassiti riferibili al genere *Toxoplasma*.

Gli strisci degli altri organi interni, del sangue prelevato dal cuore e del contenuto intestinale risultarono negativi. Le prove culturali allestite con materiale prelevato dai vari organi interni risultarono negative per i comuni germi patogeni.

Coniglio n. 1. — Venne inoculato il 5 marzo 1940 con materiale prele-

vato dagli organi della cavia n. 9: 1 cc. di emulsione di gr. 1 di cervello spappolato in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

La curva termica, normale nei primi giorni dopo l'inoculazione sperimentale, cominciò ad avere andamento irregolare dal 15 marzo in poi, con deviazioni piuttosto sensibili. Il 24 marzo, infatti, la temperatura si abbassò a 36°,3; il 26 si registrò un abbassamento a 36°,5, il 27 un innalzamento termico a 40°,1. La mattina del 30 marzo si ebbe un abbassamento a 36°,2 ed alle ore 15 dello stesso giorno l'animale venne a morte.

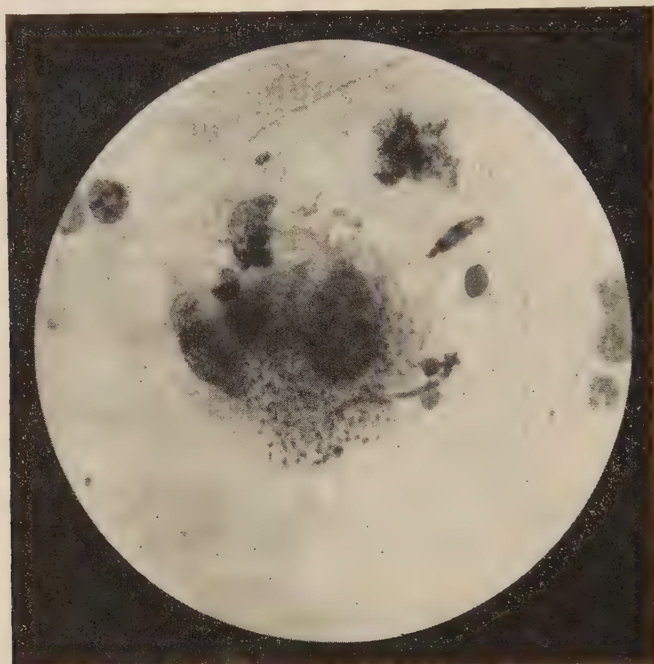


FIG. 2. — Vitello n. 33 - Fegato (striscio).
Cellule endoteliali con toxoplasmi situati sia in corrispondenza del nucleo che del citoplasma.
(Ob. 100x, Oc. 6x).

Negli ultimi giorni le condizioni generali dell'animale divennero scadenti ed all'esame clinico rivelò: inappetenza, svogliatezza nei movimenti, abbattimento notevole e turbe nervose. Alcune ore prima della morte non fu più capace di reggersi in piedi.

Gli esami microscopici del sangue risultarono sempre negativi per ematozoi parassiti, malgrado negli ultimi giorni si riscontrasse: anisocitosi e poichilocitosi. Gli esami delle feci risultarono sempre negativi.

Alla necroscopia l'animale presentò: stato di nutrizione scadente, mucose pallide, peritoneo congesto con discreta raccolta di essudato di colore

giallo-citrino nel cavo peritoneale, intestino con scarso alimento, milza congesta ed aumentata di volume, reni congesti e degenerati, ghiandole linfatiche addominali ipertrofiche, pleure e pericardio lievemente arrossati, miocardio degenerato, cervello con fatti di rammollimento e stravasi sanguigni. Null'altro venne rilevato a carico degli altri organi interni, del sistema muscolare e dei comuni tegumenti.

Gli esami degli strisci del fegato, della milza, dei reni e del materiale

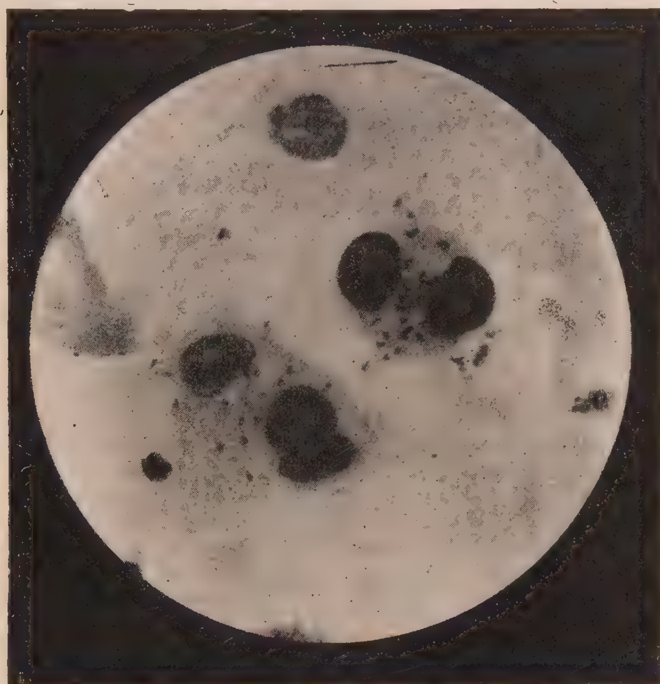


FIG. 3. — Coniglio n. 1 - Pericardio.
Toxoplasmi situati in corrispondenza di cellule endoteliali con qualche elemento parassitario già libero od in procinto di abbandonare la cellula.
(Ob. 100x, Oc. 6x).

prelevato dal peritoneo e dal pericardio, misero in evidenza parassiti riferibili al genere *Toxoplasma*.

Gli strisci degli altri organi interni e del sangue prelevato dal cuore risultarono negativi. L'esame del contenuto intestinale risultò negativo. Le prove culturali, allestite con materiale prelevato dai vari organi interni, risultarono negative per germi patogeni.

Vitello n. 214. — Venne inoculato il 19 aprile 1940 con materiale prelevato dagli organi del vitello n. 33: 3 cc. di emulsione di gr. 2 di milza spappolata in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

La mattina dopo l'inoculazione sperimentale la temperatura si abbassò a 36°,8, ma la sera dello stesso giorno s'innalzò a 39°,5. Dopo un innalzamento a 40°,2 verificatosi la sera del 22 aprile, la curva termica oscillò tra 38° e 39°C., con remissioni sotto il 38°C. Il 6 maggio la temperatura si abbassò a 36°,6 e la sera del giorno appresso s'innalzò a 39°,8. L'8 maggio si registrò una temperatura di 36°,6. Nei giorni successivi la curva termica mantenne andamento irregolare con oscillazioni sensibili.

Quindici giorni dopo l'inoculazione sperimentale, il vitello cominciò a dimagrare presentando talvolta inappetenza, abbattimento e dispnea. Tali

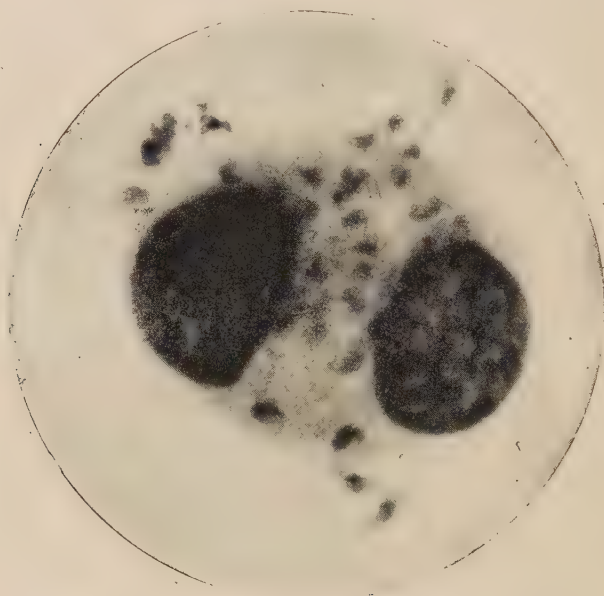


FIG. 4. — Coniglio n. 1 - Pericardio.
Cellula endoteliale in divisione con toxoplasmi. (Particolare della fig. 2).

sintomi si fecero più frequenti nella seconda metà di maggio. Nei primi giorni di giugno l'animale presentò: inappetenza, svogliatezza, dispnea, abbattimento notevole e turbe nervose.

Il 13 giugno l'animale non si reggeva in piedi e la temperatura si abbassò a 36°C. Venne a morte nello stesso giorno.

Gli esami del sangue, fin dalla seconda metà di maggio misero in evidenza: anisocitosi, poichilocitosi ed eosinofilia. Gli esami delle feci risultorono più volte positivi per rare uova di fasciola epatica.

Alla necroscopia il vitello presentò: stato di nutrizione scadente, mucose pallide ed itteriche. Nella cavità addominale: peritoneo arrossato e

congesto con presenza di essudato di colore giallo-citrino nel cavo peritoneale, intestino con scarsissimo alimento, milza ipertrofica, fegato congesto con fatti di periangiocolite distomatosa e presenza di distomi (Distomum epaticum) nei vasi biliari, reni congesti, ghiandole linfatiche addominali aumentate di volume. Nella cavità toracica: pericardio lievemente arrossato e miocardio degenerato. Nella cavità cranica: meningi ispessite, cervello con vasi cerebrali iniettati e stravasi sanguigni.

Gli esami degli strisci della milza, dei reni, delle ghiandole linfatiche meseraiche e del cervello, come pure gli esami microscopici del materiale prelevato dal peritoneo e dal pericardio risultarono positivi per parassiti riferibili al genere *Toxoplasma*. Gli strisci degli altri organi interni invece risultarono negativi. Gli esami microscopici del sangue prelevato dal cuore misero in evidenza: anisocitosi, poichilocitosi, policromatofilia ed eosinofilia. L'esame microscopico del contenuto intestinale mise in evidenza uova di fasciola epatica. Le prove culturali, eseguite con materiale prelevato dai vari organi interni, riuscirono negative per germi patogeni.

Vitello n. 281. — Venne inoculato il 19 aprile 1940 con materiale prelevato dagli organi del vitello n. 33: 3 cc. di emulsione di gr. 2 di cervello pestato in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

Nei primi giorni dopo l'inoculazione sperimentale, la curva termica ebbe delle oscillazioni piuttosto sensibili, ma nei giorni seguenti si stabilizzò tra 38° e 39°C. Nei primi giorni di giugno si notarono altre deviazioni termometriche che . scomparvero nella seconda decade dello stesso mese. Successivamente la curva termica si mantenne normale fino alla fine del luglio seguente.

Durante il periodo di osservazione, l'animale non manifestò disturbi degni di rilievo.

Gli esami del sangue e delle feci risultarono sempre negativi.

Coniglio n. 2. — Venne inoculato il 19 aprile 1940 con 1 cc. di emulsione di milza del vitello n. 33 (milza gr. 2, spappolata in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

La curva termica mantenne andamento regolare sino alla fine di luglio 1940, malgrado si fossero registrati due innalzamenti a 40°C. il 7 e l'11 maggio. Mai l'animale manifestò disturbi degni di rilievo.

Gi esami del sangue e delle feci risultarono sempre negativi.

Cavia n. 11. — Venne inoculata il 19 aprile 1940 con materiale prelevato dagli organi del vitello n. 33: 1 cc. di emulsione di gr. 2 di rene spappolati in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

La curva termica, se ebbe delle lievi deviazioni, mantenne andamento

regolare fino al luglio 1940. Durante il periodo di osservazione, mai l'animale manifestò disturbi degni di rilievo.

Gli esami del sangue e delle feci risultarono sempre negativi.

Cavia n. 12. — Venne inoculata il 19 aprile 1940 con emulsione di rene del vitello n. 33 (rene gr. 2 spappolato in mortaio con 10 cc. di soluzione fisiologica.

La curva termica, se ebbe delle lievi deviazioni, mantenne andamento regolare sino al luglio 1940. Mai l'animale, durante il periodo di osservazione, mostrò disturbi degni di rilievo.

Gli esami del sangue e delle feci risultarono sempre negativi.

Nei preparati microscopici i Toxoplasmi si presentano come organismi allungati, piriformi, talvolta incurvati a *S* od a semiluna, a grossa virgola e rotondeggianti. I parassiti allungati, di regola, sono appuntiti alla parte opposta dove riposa il nucleo, il quale è per lo più situato nella parte più larga del protoplasma. L'altra estremità di ogni elemento parassitario è quasi sempre smussata e rotondeggiante. Solo qualche rara volta, questo polo, era anch'esso assottigliato.

All'esame a fresco i Toxoplasmi sono immobili ed ogni singolo parassita è costituito dal nucleo, che si distingue per la sua rifrangenza, e dal protoplasma.

Nei preparati colorati il nucleo si colora in violetto-scuro ed in genere è composto di piccoli granuli di cromatina (di varie dimensioni) riuniti insieme più o meno strettamente. Ordinariamente, il nucleo, ha forma rotondeggiante od ovalare; raramente è allungato, quadrangolare, incurvato od ellittico. Nei Toxoplasmi allungati, il nucleo, è situato a circa metà lunghezza del corpo parassitario più o meno spostato verso il polo smussato (talvolta è addossato ad esso), meno frequentemente, e solo leggermente, spostato verso il polo assottigliato. Mai ho notato il nucleo in corrispondenza dell'estremità appuntita o nelle sue immediate adiacenze.

Rispetto al protoplasma il nucleo può essere centrale od eccentrico e talvolta addirittura addossato ai margini laterali del protoplasma. In quest'ultimo caso i Toxoplasmi rotondeggianti assumevano figura a castone. Sia centralmente che eccentricamente, nei parassiti allungati, il nucleo poteva occupare una parte o quasi tutta la larghezza del corpo parassitario, sebbene non fosse infrequente, rinvenire Toxoplasmi con nucleo voluminoso il quale occupava l'intera larghezza del protoplasma parassitario. Talvolta, nei parassiti snelli, il nucleo, occupando tutta la larghezza, sembrava facesse ernia e debordasse dai margini laterali del protoplasma.

Il protoplasma si colora in turchino e mai in esso ho notato granuli di pigmento.

Generalmente i Toxoplasmi allungati osservati misurano da 3 a 6 μ di lunghezza e da 1,5 a 3 μ di larghezza, mentre i parassiti rotondeggianti misuravano da 2 a 7 μ di diametro. Sebbene fossero stati anche notati elementi parassitari di più piccole dimensioni.

I Toxoplasmi sono stati rinvenuti anche in moltiplicazione. In alcuni parassiti era avvenuta la divisione semplice o multipla del solo nucleo (2, 3, 4, 5, 6 nuclei figli in via di divisione o già completamente divisi), mentre il protoplasma parassitario aumentato era ancora unico. In questo caso, non era infrequente, che uno, alcuni o tutti i nuclei figli si andassero a disporre lungo i margini laterali del protoplasma ed al polo smussato. In altri elementi parassitari, invece, la divisione del nucleo e del protoplasma (il protoplasma si divide sempre in senso longitudinale) era già avvenuta, ma gli elementi di nuova formazione rimanevano ancora uniti. Altri, infine, quasi completamente divisi, rimanevano ancora uniti per l'estremità appuntita.

Nel corso delle osservazioni riportate i parassiti sono stati rinvenuti nel peritoneo, nelle pleure, nel pericardio, nel fegato, nella milza, nei reni, nelle ghiandole linfatiche, nel cervello, nelle meningi sia liberi che nelle cellule endoteliali. I Toxoplasmi sono stati altresì rinvenuti anche liberi nell'essudato peritoneale. Solo raramente fu possibile metterli in evidenza liberi nel plasma del sangue periferico, nei leucociti (per lo più nei monociti) e nelle cellule endoteliali circolanti.

In tutti i casi, i parassiti, si potevano presentare ad elementi isolati, riuniti in coppia o a più elementi, o addirittura ammassati. Notata venne anche la disposizione a rosetta o margherita.

Nelle cellule endoteliali i Toxoplasmi sembravano apparentemente situati nel citoplasma, mentre altri elementi parassitari, per lo più di forma rotondeggiante, vennero notati in corrispondenza della sostanza nucleare (i più grossi osservati raggiungevano 5 μ di diametro).

Nelle cellule endoteliali quando i parassiti erano numerosissimi potevano essere raggruppati entro una sottilissima capsula parassitaria che sembrava si fosse costituita a spese della sostanza cellulare. Tali capsule sono state notate anche staccate dalle cellule (nell'essudato peritoneale e pericardico). Entro una di queste capsule sono stati rinvenuti n. 72 elementi parassitari. In alcuni preparati microscopici, era inoltre visibile la rottura della capsula parassitaria e l'inizio della fuoriuscita dei Toxoplasmi (schizogonia?).

Delle 8 cavie inoculate col materiale fornito dalle cavie n. 236 e n. 237, morte di Toxoplasmosi presso l'Istituto per la profilassi e lo studio delle Rickettsiosi, le cavie: n. 2, n. 3, n. 5, n. 6 e n. 7 vennero a morte di Toxoplasmosi sperimentale, mentre le cavie: n. 1, n. 4 e n. 8, malgrado avessero mostrato disturbi clinici, sopravvissero.

Delle cavie infettate col materiale della cavia n. 5, la cavia n. 9 venne a morte, mentre la cavia n. 10 dopo avere presentato disturbi piuttosto gravi, sopravvisse.

Il vitello n. 33 ed il coniglio n. 1 inoculati con materiale della cavia n. 9 vennero ambedue a morte.

Mentre il materiale infettante fornito dal vitello n. 33, fu capace di determinare la Toxoplasmosi che portò a morte il vitello n. 214, nel vitello n. 281, nel coniglio n. 2 e nelle cavie n. 11 e n. 12 non provocò la malattia.



FIG. 5. — Cavia n. 5 - Peritoneo (striscio).
Cellule endoteliali con toxoplasmi. Centralmente sembra sia avvenuta la rottura di una capsula parassitaria e la conseguente fuoruscita dei toxoplasmi.
(Ob. 100x, Oc. 6x).

La quantità di materiale infettante inoculato non ebbe alcuna influenza sulla percentuale di morbilità e di mortalità della Toxoplasmosi sperimentale, poichè sia gli animali morti che i sopravvissuti erano stati inoculati con analoghe dosi differenti di emulsioni di organi ricchi di Toxoplasmi.

In tutti gli animali venuti a morte, vennero costantemente osservati in vita: inappetenza, abbattimento grave, turbe nervose e curve termiche con andamento irregolare; ed alla necroscopia: lesioni a carico delle sierose, della milza (splenomegalia), del fegato, dei reni, della ghiandole linfatiche e del cervello.

I Toxoplasmi, vennero rinvenuti: nel peritoneo, nelle pleure, nel pericardio, nella milza, nel fegato, nei reni, nelle ghiandole linfatiche, nel cerultimi quattro animali, può essere addebitato alla provenienza del materiale



Fig. 6. — Coniglio n. 1 - Milza (striscio).
Toxoplasmi che sembrano situati entro il nucleo delle cellule endoteliali.
(Ob. 100x, Oc. 6x).

vello e nel midollo spinale, sia liberi che nelle cellule endoteliali. Sebbene molto raramente, i Toxoplasmi vennero altresì rinvenuti liberi nel plasma del sangue periferico, nei leucociti e nelle cellule endoteliali circolanti.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Le ricerche esposte portano un modesto contributo alle conoscenze che si hanno sul Toxoplasma e sulla malattia che esso determina.

Delle 10 cavie inoculate con differenti dosi di emulsioni di organi di cavie morte di Toxoplasmi, sei vennero a morte, le altre quattro, invece, malgrado avessero mostrato manifestazioni di malattia, sopravvissero.

Ciò dimostra che la quantità di materiale infettante inoculata non ebbe influenza degna di rilievo nella determinazione della forma di Toxoplasmosi,

dato che i casi di morte e di malattia si verificarono, indifferentemente, nelle cavie che avevano avuto inoculate le dosi minime e massime di emulsioni di organi parassitati. Cioè la patogenicità dell'unico ceppo parassitario impiegato, non era in rapporto al volume dell'agente eziologico, ma alla maggiore o minore resistenza organica degli animali inoculati.

Il materiale infettante prelevato dagli organi di una cavia morta di Toxoplasmosi ed inoculato al vitello n. 33 ed al coniglio n. 1, fu capace di determinare, in questi due animali, la malattia che in 45 e 25 giorni, li portò rispettivamente a morte. Cioè il ceppo di *Toxoplasma*, naturalmente rinvenuto nelle cavie, non aveva specificità per questi soli animali, ma era capace di determinare l'infezione in altri animali appartenenti a specie diverse.

Il materiale infettante prelevato dagli organi del vitello n. 33 portò a morte il vitello n. 214, già tarato da distomatosi epatica, e non diede disturbi di sorta al vitello n. 281, il coniglio n. 2 ed alle cavie n. 11 e n. 12.

E' già stato detto che il ceppo parassitario di Toxoplasma proveniva originariamente dalla infezione naturale delle cavie (cavie n. 236 e n. 237 morte di Toxoplasmosi naturale presso l'Istituto delle Rickettsiosi). Coll'emulsione di rene della cavia n. 9, morta di Toxoplasmosi sperimentale, ho determinato la malattia nel vitello n. 33.

Ora, come si spiega che, mentre l'emulsione di organi di vitello n. 33 fu capace, in 55 giorni, di portare a morte il vitello n. 214, lo stesso materiale infettante, inoculato al vitello n. 281, al coniglio n. 2 ed alle cavie n. 11 e n. 12 non abbia determinato in essi alterazioni degne di rilievo?

Nè l'insuccesso della trasmissione sperimentale della malattia a questi infettante dagli organi parassitati del vitello n. 33, inquantochè le cavie n. 11 e n. 12 avrebbero dovuto essere particolarmente sensibili ad un ceppo parassitario che aveva avuto origini naturali nelle cavie.

Probabilmente questa mancata infezione deve ricercarsi nell'affievolimento del potere patogeno subito dal ceppo di Toxoplasma nei vari passaggi da animale ad animale e forse nella scarsa recettività individuale del vitello n. 281, del coniglio n. 2 e delle cavie n. 11 e n. 12. Con molte probabilità il ceppo parassitario si era talmente invecchiato da non essere più capace di determinare la Toxoplasmosi in animali integri nella loro sanità.

La conferma di ciò si trova nell'avere contratto la malattia il vitello n. 214, il quale prima di essere inoculato col materiale infettante di Toxoplasmi, era già affetto di una forma lieve di distomatosi epatica. Antica infestazione che sfuggì alle indagini microscopiche delle feci dei giorni che precedettero l'inoculazione sperimentale di quest'animale, nel quale, determinò quella minorazione organica sufficiente per esaltare la virulenza dei Toxoplasmi inoculati. La Toxoplasmosi che si venne a determinare assieme alla distomatosi epatica portarono, infatti, l'animale a morte.

D'altra parte, volendo oggi pesare le opinioni della maggior parte degli

autori e specialmente di quelli che hanno maggiormente studiato i Toxoplasmi, si può affermare senza esitazione che nulla è stato ancora dimostrato per una sistematica e specificità di questi protozoi nell'uomo e nelle varie specie animali.

Anche la distinzione dei Toxoplasmi degli uccelli da quelli dei mammiferi voluta da alcuni AA. è ancora da dimostrare, dato che i Toxoplasmi dei mammiferi sono stati facilmente inoculati agli uccelli (Splendore, De Mello, e Carini, Nicolau e Kopcioska ecc.).

Come è stato riportato nella prima parte di questo lavoro, molti studiosi sono dubbiosi sulle diverse specie di Toxoplasma create ed alcuni asseriscono esistere in natura una sola specie di Toxoplasma (Mesnil, Nicolau e Kopcioska, Boisseau e Nodenot).

Mariani, all'uopo, sul ceppo di Toxoplasma, anche da me studiato, scrive testualmente: *Dovrei concludere di avere osservato il « Toxoplasma caviae »* (Carini e Migliano 1916) *essendo questa l'unica specie trovata nelle cavie, ma ritengo più prudente non precisare la specie, prospettando solo il dubbio che si tratti di « Tox. gondii ». E' del resto opinione corrente che esiste un solo Toxoplasma capace di parassitare diversi ospiti e quindi più che di specie si debba parlare di varietà da adattamento ad un dato animale.*

Tenendo conto che, oltre per le cavie, il ceppo di Toxoplasma studiato si mostrò patogeno anche per i vitelli n. 33 e n. 214 ed il coniglio n. 1, i quali vennero a morte di Toxoplasmosi sperimentale, ritengo non dovere aggiungere, altro alle conclusioni di Mariani, perchè l'ipotesi dell'esistenza in natura di una unica specie di *Toxoplasma*, viene avvalorata dalle presenti osservazioni, malgrado ulteriori ricerche potranno meglio chiarire la natura e la sistematica dei Toxoplasmi.

RIASSUNTO

L'A. studia sperimentalmente un ceppo di *Toxoplasma* rinvenuto nelle cavie che, oltre a dimostrarsi patogeno per questi animali, può determinare la Toxoplasmosi mortale a conigli e bovini (vitelli) sani inoculati.

SUMMARY

The author reports an experimental study of a strain of *Toxoplasma* found in Guinea-pigs; this strain showed to be pathogenous for these animals and may determine a lethal toxoplasmosis in the inoculated rabbits and cattle (calves).

RÉSUME'

L'auteur a étudié experimentalement une souche de *Toxoplasma* trouvée dans des cobayes; cette souche s'est demontrée non seulement pathogène pour ces animaux, mais a déterminé aussi des toxoplasmoses mortelles dans les lapins et les bovins (veaux) inoculés.

LETTERATURA

BOISSEAU R. et NODENOT L.: Un cas de Toxoplasmose spontanée du Cobaye observé à l'Institut Pasteur de Brazzaville (A. E. F,). *Bull. Soc. de Path. Exot.*, t. XXIX. n. 2. Paris, 1936.

CARINI et MIGLIANO: Sur une Toxoplasmose du Cobaye (*Toxoplasma caviae*). *Bull. Soc. Path. Exot.*, t. IX. Paris, 1916.

FRANCHINI G. e GIORDANO N.: Patologia e parassitologia dei paesi caldi. Stabilimento Poligrafico Artioli. Modena, 1934.

GIOVANNOLA A.: Il *Plasmodium gallinaceum* Brumpt 1935, i così detti corpi Toxoplasma-simili ed alcune inclusioni di probabile natura parassitaria nei globuli bianchi del *Gallus gallus*. *Riv. di Parassitologia*, t. II, n. 2. Roma, 1938.

KIKUTH W. und MUDROW L.: Malariaübertragungsversuche mit Blut und Organen sporozoiteninfizierter Kanarienvögel. *Riv. di Malariologia*. Roma, 1938.

KOPCIOSKA L. et NICOLAU S.: Toxoplasmose spontanée du Chimpanzé. *C. R. Soc. Biol.*, t. 129. Paris, 1938.

MESNIL F.: *Bull. Inst. Past.* Pag. 71 (Analyse). Paris, 1918.

NICOLAU S.: Infection toxoplasmique spontanée du Cobaye. *C. r. S. B.*, t. CX. Paris, 1932.

NICOLAU S. et KOPCIOSKA L.: Infection expérimentale de petits oiseaux per le *Toxoplasma canis*. *C. S. Soc. Biol.*, t. CXIX. Paris, 1935.

NICOLAU S. et KOPCIOSKA L.: La mégamononucléose sanguine dans l'infection toxoplasmique espérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, t. 126. Paris, 1938.

RAFFAELE G,: Sulle cosidette Toxoplasmosi dei passeri. *Riv. di Malariologia*, t. 15. Roma, 1932.

RAFFAELE G.: Evoluzione di *Plasmodium*, *Toxoplasma* ed altri microrganismi negli organi interni dei vertebrati. *Riv. di Malariologia*, t. 17. Roma, 1938.

SABIN A. B. and OLITSKY P. K.: Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. Science, t. 85. 1937.

TADDIA L. e VALENTINO D.: Ricerche sugli emoparassiti degli uccelli del Veneto. *Arch. Scien. Med. e Col.*, vol. XX, n. 12. Roma, 1939.

WENYON C. M.: Protozoology - Ballière Tindall et Cox. Vol. II. London, 1926.

WOLF A. and COWEN D.: Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon: new protozon disease in man. *Bull. Neurol. Inst.*, t. VI. New York, 1937.

WOLF A. and COWEN D.: Granulomatous encephalomyelitis due a to Protozoan (*Toxoplasma* or *Encephalitozoon*). II: Identification of a case from the litterature. *Bull. Neurol. Inst.*, t. 7. New York, 1938.

WOLF A., COWEN D. and PAIGE B. H.: Toxoplasmic encophalomyelitis. Experimental trasmission of the infection to animals from a human infant. *The journal of experimental medicine*, t. 71. New York, 1940.

WOLFSON F.: Experimental transmission of Toxoplasma in Canaries. *Journ. of Parasitol.*, t. 23. New York, 1937.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

SU DI UNA METACERCARIA DI *ECHINOSTOMA* RISCONTRATA IN *BULINUS CONTORTUS* E IN *PHYSOPSIS AFRICANA* NEL FEZZAN (SAHARA LIBICO) (*)

Dott. FRANCO BOSCARDI

Istituto di Clinica Medica Generale dell'Università di Roma
Direttore: Prof. C. Frugoni

Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma
Direttore inc.: Prof. V. Vanni

In occasione di un'inchiesta epidemiologica sulla schistosomiasi ematobia nell'esc-Sciati (Fezzan, Sahara libico), in numerosissimi esemplari di *Bulinus contortus* e di *Physopsis africana,* raccolti in alcune sorgenti del villaggio di Ghira, sezionati ed esaminati a fresco, abbiamo notato la presenza di un gran numero di metacercarie, appartenenti tutte ad una medesima specie.

Le metacercarie al momento della raccolta dei molluschi sembravano presentare un grado di sviluppo iniziale uguale per tutte (fig. 1). Dopo aver mantenuti per diversi giorni i molluschi in osservazione, sacrificandone uno o due giornalmente, si notava che fra le cisti ve ne erano alcune che s'ingrandivano in modo evidente, mentre la larva all'interno andava assumendo un aspetto differente dalle altre; e cioè mentre inizialmente tutte le larve avevano un aspetto ialino, dopo qualche giorno alcune di esse si distinguevano dalle altre per il delinearsi nel loro interno dei grossi condotti escretori che andavano assumendo un colorito scuro, si facevano dapprima tortuosi, indi ramificati e si riempivano di una grande quantità di

(*) Ringrazio vivamente il Prof. A. Palombi della Stazione Zoologica di Napoli, che mi è stato di consiglio nell'esecuzione del lavoro.

globuli bruni (fig. 2). Non sappiamo se tale fenomeno procedesse di pari passo con una fase di maturazione della larva, in quanto un po' alla volta tutte le metacercarie, nei molluschi sezionati dopo alcune settimane, presentavano le medesime modificazioni.

Liberata della membrana cistica, provocandone la rottura per compressione fra porta e coprioggetti, la larva compiva vivaci movimenti di allun-

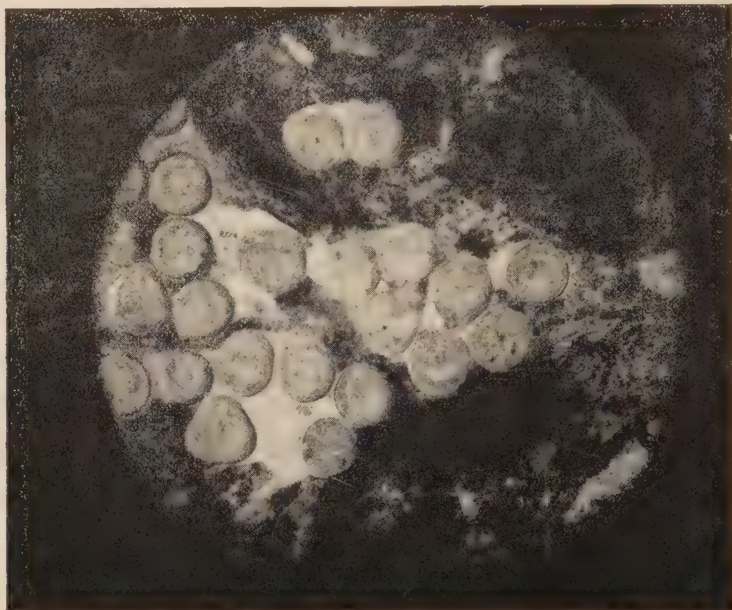


FIG. 1. — Metacercarie nel tessuto lasso periesofageo di Bulinus contortus al momento della cattura del mollusco. Preparato a fresco. (x 50).

gamento e di retrazione; essa procedeva tanto in senso cefalico che caudale; le ventose aderendo funzionavano da organi di locomozione.

Sulla larva libera (fig. 3) erano meglio apprezzabili i particolari anatomici che brevemente descriveremo.

La larva, appiattita dorso-ventralmente, ha la forma di una foglia elissoidale. La porzione cefalica ha aspetto mutevole, ora larga, cuoriforme, ora allungata e sottile, a seconda che la larva introfletta o estrofletta la ventosa orale. Nelle figure schematiche (fig. 4 e 5) sono ritratti questi diversi atteggiamenti in rapporto ai quali la corona di spine di cui è armata l'estremità cefalica viene ad assumere diverse configurazioni: a forma di ferro di cavallo, con le spine distanziate a punta rivolta verso l'esterno del cerchio quando la ventosa orale, disposta sub-termino-ventralmente, è estroflessa; ad anello quasi completo, ristretto, con spine ravvicinate, alter-



FIG. 2 — Le stesse metacercarie a più forte ingrandimento (x 160) in Bulinus, mantenuto in acquario, 20 giorni dopo la cattura.

nativamente sovrapposte, a punte rivolte verso l'avanti quando la ventosa è introflessa.



FIG. 3. — Metacercaria liberata della membrana cistica (x 250).

La ventosa ventrale trovasi all'unione del terzo medio col terzo posteriore del corpo ed è più grande della ventosa orale.

La cuticola della larva, nella parte antistante alla ventosa ventrale, è fornita di numerosissimi brevi aculei.

Il numero delle spine costituenti la corona cefalica, contate in venti

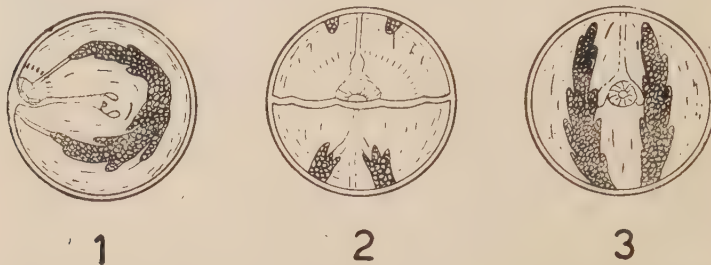


Fig. 4. — Figura schematica riproducente la metacercaria incistata. Larva vista di fianco (1), ventralmente con le estremità combacianti (2), dorsalmente (3).

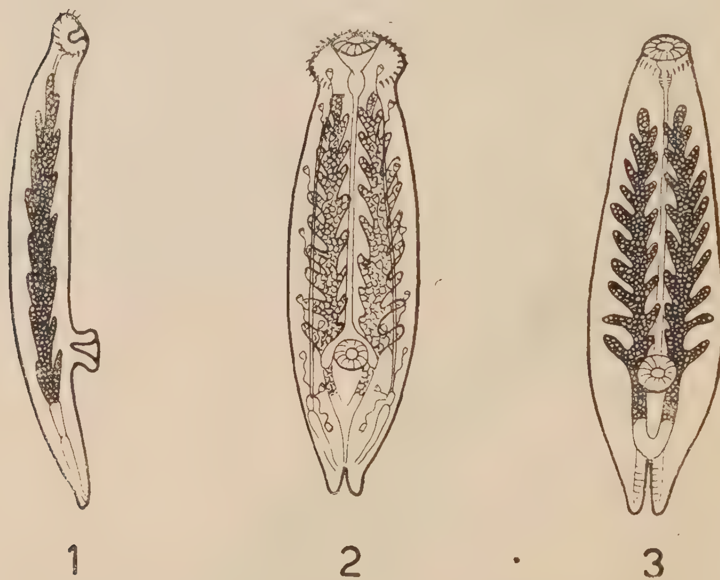


Fig. 5. — Larva, liberata della membrana cistica, in figura schematica, di cui sono stati ritratti i diversi atteggiamenti dell'estremità cefalica, ed i principali organi.

esemplari, risultò variabile da 33 a 37, con un massimo di frequenza di 35. Probabilmente nella conta vi fu un errore in difetto quando se ne contarono meno di 35 ed un errore in eccesso, quando ne furono contate più di 35; ciò per la difficoltà di contare con esattezza le spine poste in differenti piani e posizioni. Le spine sono poste su un'unica fila; quando sono ravvi-

cinate, a ventosa orale introflessa, assumono una disposizione a petali di crisantemo; hanno la forma di un sigaro, con sezione quadrilatera ad angoli curvi. Le dimensioni sono segnate nello specchietto sotto riportato. Le spine ai due estremi della fila sono più grandi di quelle centrali e queste sono alternativamente una più grande ed una più piccola.

Il tubo intestinale è costituito da un breve prefaringe, che si origina dalla bocca situata al fondo della ventosa orale, seguito da un robusto anello faringeo e quindi da un sottile esofago che a livello del bordo anteriore della ventosa ventrale si divide in due brevi ciechi intestinali, il cui fondo non oltrepassa di molto il bordo posteriore della ventosa stessa.

L'apparato escretore risulta composto di 12 paia di fiamme vibratili, i cui canalicoli confluiscono in due canali escretori, che, dapprima sottili, dopo aver descritto una lunga ansa prima in senso cefalico caudale poi in senso caudale cefalico ad un certo punto si dilatano e percorrendo nuovamente dall'innanzi all'indietro la cavità corporea si fanno tortuosi e ramificati e si riempiono, nelle forme più mature, di granuli scuri. Presso l'estremità caudale detti canali si riuniscono descrivendo nell'insieme una curva a ferro di cavallo, e dal punto di unione di essi si parte un breve canale, munito di robusto sfintere, terminante nel poro escretorio. Non si nota perciò presenza di vescicola escretrice.

La larva vivente, liberata dalla cisti, con contrazioni ritmiche del corpo, emetteva dal poro escretore i granuli contenuti nell'ultima parte del canale escretore; svuotatasi di tali granuli la larva assumeva novamente un aspetto ialino.

Riportiamo le dimensioni medie della cercaria incistata e libera, delle ventose e delle spine:

Metacercaria, diametro . .	mm.	0.154	(massimo 0.195, minimo 0.148).
Cercaria, lunghezza . . .	»	0.348	(massimo 0.440, minimo 0.280).
larghezza	»	0.112	(a livello della ventosa ventrale).
Ventosa orale: diametro .	»	0.044	
Ventosa ventrale, diametro	»	0.065	
Spine: lunghezza	»	0.021	(massimo 0.027, minimo 0.015).
spessore	»	0.002-0.003.	

Nonostante lo studio dettagliato dei particolari anatomici della larva non ci è stato possibile giungere ad una identificazione di essa per quanto riguarda la specie.

I caratteri morfologici generali e la corona di spine di cui è armata la ventosa orale fanno ascrivere la larva alla famiglia *Echinostomidae*, la quale comprende specie parassiti allo stato adulto di uccelli e di rettili. La presenza della larva, nello stadio di metacercaria, negli organi di *Bulinus*

e di *Physopsis* ci indirizza verso un trematode che vive adulto nell'intestino di un uccello che pratica gli stagni e che dei molluschi si nutre.

La localizzazione delle metacercarie intorno all'esofago e all'intestino indica la via di penetrazione delle cercarie nel mollusco 2° ospite intermedio, attraverso il canale digerente, dopo ingestione. L'esistenza delle sole metacercarie in *Bulinus* e *Physopsis* induce a pensare che le precedenti fasi di moltiplicazione partenogenetica del verme dal miracidio alle cercarie si svolgono in un altro mollusco 1° ospite intermedio.

Per quanto riguarda la specie ci si potrebbe orientare verso una forma comunissima di *Echinostoma*: l'*E. revolutum* (Froel., 1802) (= *E. echinatum*, Zed.), la quale possiede 35 spine, però tutte della medesima grandezza. Per lo stesso motivo la metacercaria in oggetto non è identificabile con *E. mendax*, Dietz, *E. echinocoefalum*, Rud., che posseggono 37 spine ed *E. discinctum*, Dietz, *E. uncantum*, Dietz ed altri, che oltre al numero ed alla forma delle spine hanno particolarità anatomiche diverse [Dietz (1)]. Inoltre tutte queste specie, per quanto ci è noto, non sono state riscontrate nel Nord Africa [Odhner (2) Brumpt (3), Neveu Limaire (4)].

In Egitto Sonsino (5), in *Physa alessandrina*, nei dintorni de Il Cairo trovò durante i mesi estivi, redie, cercarie e metacercarie di un *Echinostoma* che assegnò, in seguito allo sviluppo da lui ottenuto in *Anas*, ad *E. recurvatum* (v. Linst.). Il numero delle spine del collare cefalico è però, in questa specie, di 45.

Lo stesso Sonsino trovò in *Cleopatra bulimoides* ed in *Melania tuberculata* metacercarie sole di un *Echinostoma* probabilmente appartenente a specie diversa da *E. recurvatum*, v. Linst. Quale sia questa specie egli non dice, nè dà i caratteri particolari di queste metacercarie.

Joyeux (6) e Langeron (7) che hanno studiato la fauna elmintologica dell'Africa Settentrionale Francese non hanno descritto forme simili a quella da noi illustrata.

Zavattari (8, 9, 10) nelle sue inchieste sulla fauna ed in particolare sulla malacofauna e nei suoi studi sulla parassitologia della Libia non ricorda forme di trematodi simili alla nostra.

Data l'impossibilità di eseguire ricerche sperimentali, allo scopo di procurare lo sviluppo del verme e di identificarlo quindi nello stadio adulto, non ci è possibile classificare la metacercaria, nè assimilarla con alcuna delle specie note.

Per tal motivo la segnaliamo colla denominazione provvisoria di « *Metacercaria varieechinata* ».

RIASSUNTO

L'A. segnala la presenza nel Fezzan (Sahara libico) di una metacercaria di *Echinostoma* in *Bulinus contortus* e *Physopsis africana*, che, nomina provvisoriamente *Metacercaria varieechinata*.

RÉSUME'

L'A. signale la présence dans le Fezzàn (Sahara Libyque) d'une métacercaire d'Echinostomidé en *Bulinus contortus* et *Physopsis africana*, à laquelle, ne pouvant pas la classer parmi les formes larvales d'Echinostomidés déià connues, il donne provisoirement le nom de *Metacercaria varieechinata*.

SUMMARY

The Author draws attention on the presence in Fezzàn (Libyan Sahara) of a metacercaria Echinostoma in *Bulinus contortus* and *Physopsis africana*, and being unable to classify it among the larval forms of already known Echinostomas, he names it provisionally *Metacercaria varieechinata*.

LETTERATURA

(1) DIETZ: Die Echinostomiden der Vogel. *Zool. Jahrb.* Abt. Syst., Suppl. *12*, 1910.

(2) ODHNER T.: Nordostafricanische Trematoden. *Results of the Swedish Zoological Expedition to Egypt and the White Nile*, n. *23*, 1910.

(3) BRUMPT E.: Precis de Parasitologie. Masson Ed., Paris, 1936.

(4) NEVEU LEMAIRE M.: Traité d'Helmintologie Médicale et Vetérinaire, Vigot Fr. Ed., Paris, 1941.

(5) SONSINO P.: Studi sui parassiti di molluschi d'acqua dolce nei dintorni de il Cairo in Egitto. *Festschr., R. Luckart*, *18*, 132-146, Leipzig, 18992.

(6) JOYEUX C.: Recherches sur la Faune Helmintologique africaine. *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, *12*, 328, 1923,

(7) LANGERON M.: Recherches sur les cercaires des piscines de Gafsa. *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, *13*, 19, 1924.

(8) ZAVATTARI E.: Prodromo della fauna in Libia. Tipografia Cooperativa, Pavia, 1934.

(9) ZAVATTARI E.: Sulla grande frequenza della Schistosomiasi vescicale nel Fezzan. *Boll. Soc. Med. Chir., Pavia*, *48*, 131-161, 1934.

(10) ZAVATTARI E.: Ambiente biologico generale, in « Il Sahara, Fezzan e Oasi di Gat ». *Pubbl. della R. Soc. Geograf. Ital.*, Roma, 1937.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA SIERODIAGNOSI NELL'AMEBIASI

G. RITA

ASSISTENTE E L. D.

Istituto di Microbiologia dell'Università di Roma

Direttore: Prof. A. Cimmino

Nel 1943, prestando servizio nel Reparto Microbiologico del « Centro Amebiasici » del Corpo d'Armata di Roma, avemmo occasione di esaminare e seguire per vario tempo un gran numero di malati di amebiasi con le forme cliniche più diverse. Pensammo così di renderci personalmente conto del valore diagnostico della deviazione del complemento applicata alla amebiasi, reazione che sperimentata, a quanto ci risulta, per la prima volta da un italiano (IZAR, 1914), fu in seguito quasi abbandonata e poi ripresa di recente sopratutto ad opera di ricercatori americani.

IZAR (1914) usando antigeni preparati mediante estrazione acquosa di feci ricche di *E. histolytica* o di pus di epatite colliquativa ottenne buoni risultati e ritenne dimostrato che nel siero di sangue di uomini affetti da amebiasi intestinale compaiono ambocettori specifici devianti il complemento.

TRIBONDEAU e FICHER (1916), SCALAS (1921) e di recente QUADRI (1942) usando antigeni preparati fondamentalmente secondo la tecnica di IZAR confermarono i risultati ottenuti da questo A., mentre HAGE (1920) non potè confermare tali dati sia usando estratti acquosi sia estratti eterei o alcolici di feci di amebiasico.

Nel 1927 CRAIG, studioso profondo dell'amebiasi dal lato microbiologico, iniziò una serie di ricerche che proseguì per molti anni chiarendo così vari lati della questione. Essendo egli riuscito ad ottenere la coltura dell'*E*

histolytica in terreni liquidi preparò, mediante estrazione acquosa o alcolica delle amebe così coltivate, degli antigeni che usò con successo nella deviazione del complemento con siero di malati di amebiasi dopo averne dimostrata la buona reattività con sieri di cani e di gatti infettati sperimentalmente con *E. histolytica*. I risultati ottenuti nello studio di varie centinaia di malati usando come antigene un estratto alcolico di amebe, dimostratosi superiore a quello acquoso, e impiegando una tecnica originale nell'esecuzione della reazione di deviazione del complemento, si possono così riassumere: *a*) nella amebiasi si ha produzione di anticorpi devianti il complemento che si mettono in evidenza con antigeni appropriati; *b*) la reazione di deviazione del complemento è specifia e abbastanza sensibile; in alcuni casi riesce positiva quando il reperto della ameba nelle feci è molto difficile o negativo; *c*) nella diagnosi della amebiasi la reazione di deviazione del complemento è un ausilio diagnostico sebbene di grande valore; il procedimento fondamentale rimane sempre quello della ricerca del parassita nel materiale patologico; *d*) la deviazione del complemento si dimostra molto utile per la diagnosi dei casi di epatite amebica e per lo studio dei portatori; *e*) uguale utilità la reazione dimostra nel controllo del trattamento degli amebiasici.

Questi dati furono confermati da numerosi AA. che qui tralasciamo per brevità rimandando alla brillante monografia di CRAIG: « Laboratory Diagnosis of Protozoan Diseases » ed estesi in seguito ad opera di REES e coll. (1942) e di KENT e REIN (1946).

Ci interessa qui far notare che CRAIG in collaborazione con SCOTT (1935) preparò anche un antigene mediante estrazione alcolica del materiale muco-ematico ottenuto dall'intestino di cani infettati con *E. histolytica*. Tale antigene mostrò nella fissazione del complemento gli stessi requisiti degli antigeni preparati dalle colture di ameba.

* * *

Nel presente studio noi abbiamo applicato la reazione di deviazione del complemento allo studio del comportamento del siero di numerosi malati di amebiasi usando un antigene preparato da materiale muco-ematico proveniente da un caso di dissenteria amebica acuta secondo la tecnica di CRAIG e SCOTT.

Preparazione dell'antigene. — Materiale muco-ematico emesso spontaneamente da un militare affetto da dissenteria acuta (provenienza Africa Settentrionale; 20-25 scariche al giorno al momento in cui fu raccolto il materiale). Il materiale era ricchissimo di forme vegetative ematofaghe di *E. histolytica*. Ad una parte di materiale posto in una beuta si aggiunsero

7 parti di alcool assoluto e si mantenne in termostato a 45°C. per 15 giorni agitando energicamente parecchie volte al giorno. Quindi si filtrò per carta ottenendo un liquido limpido di colorito giallo oro. L'antigene fu titolato nei riguardi dell'azione litica e del potere anticomplementare in confronto con sieri di soggetti normali e con il siero del paziente da cui si era prelevato il materiale mucoso per la sensibilità. Fu trovata ottimale la diluizione 1 : 4 in soluzione fisiologica.

Tecnica della reazione di fissazione del complemento. — Si usarono 0,5 cc. di ogni reagente, cioè: 0,1 cc. di siero in esame portato a 0,5 cc. con soluzione fisiologica; 0,5 cc. di antigene diluito 1 : 4; 0,5 cc. di complemento titolato prima della prova e usato a 2 volte il titolo; 0,5 cc. di ambocettore emolitico usato a 3 volte il titolo; 0,5 cc. di globuli rossi di montone al 5 %. Fissazione per un'ora a 37°C; aggiunta del complesso emolitico; lettura dopo altra mezz'ora a 37°C, eseguita sulla guida dei controlli.

Con tale metodica abbiamo saggiato il comportamento del siero di sangue di 63 malati di amebiasi e di numerosi altri soggetti o sani o affetti da malattie intestinali diverse dalla amebiasi.

Prima di passare all'esame dei risultati ottenuti desideriamo far notare che avendo osservato una reazione positiva in un siero appartenente a soggetto non amebiasico, con indagini successive potemmo mettere in evidenza trattarsi di un luetico a R. Wassermann positiva. Eseguimmo allora numerose prove di deviazione saggiando il nostro antigene di fronte a sieri Wassermann positivi e sempre ottenemmo risultati più o meno intensamente positivi. Al contrario i sieri di amebiasici che risposero positivamente con l'estratto amebico risultarono negativi alla R. Wassermann.

Dei 63 malati di amebiasi studiati 14 presentavano una dissenteria amebica acuta, 2 una epatite amebica colliquativa e i rimanenti 47 forme cliniche varie di amebiasi intestinale. In tutti questi 63 malati l'esame delle feci risultò positivo per *E. histolytica*, ad eccezione di 1 dei casi di epatite nel quale non fu possibile mettere in evidenza la presenza della ameba nel materiale fecale. Inoltre in diversi di questi casi il reperto di *E. histolytica* si associava a quello di *E. coli* o di altri protozoi.

La prova di deviazione del complemento con antigene amebico risultò positiva con diversi gradi di intensità in 58 di questi malati. Dei 5 negativi 2 erano affetti da dissenteria acuta e 3 da forme intestinali piuttosto lievi. I 2 casi di epatite dettero entrambi reazione positiva marcata. In 50 di questi 63 sieri fu anche praticata la R. Wassermann che risultò sempre negativa.

Nei soggetti sani o in quelli affetti da malattie intestinali diverse dalla amebiasi, i risultati furono sempre negativi, fatta eccezione per i sieri a R.

Wassermann positiva. Fra i soggetti sani ve ne erano alcuni che presentavano *E. coli* nelle feci.

I 12 pazienti con dissenteria amebica acuta e deviazione del complemento positiva furono seguiti nel comportamento sierologico per un certo tempo durante e dopo il trattamento specifico (emetina e stovarsolo oppure emetina e calomelano). Fu notata la persistenza della positività della deviazione del complemento quando già l'esame parassitoscopico delle feci risultava negativo. In genere la positività sierologica durava da 20 a 30 giorni più a lungo. In 3 di questi casi la deviazione del complemento era ancora positiva dopo due mesi dalla scomparsa della ameba nelle feci e tutti e 3 andarono incontro a recidiva. Purtroppo il precipitare degli eventi bellici non permise di seguire oltre questi pazienti.

Dai dati così succintamente esposti crediamo si possano trarre alcuni utili insegnamenti. Innanzi tutto viene confermato che nell'infezione da *E. histolytica* si ha la comparsa di anticorpi devianti il complemento in presenza di estratti alcolici di ameba. Tali anticorpi si possono svelare in un'alta percentuale di amebiasici, circa il 92 %, il che rende la reazione di notevole ausilio diagnostico. Nei malati trattati con cure specifiche la reazione sierologica si mantiene positiva per un certo tempo (20-30 giorni) dopo la scomparsa delle amebe dalle feci. Nei casi in cui la positività della reazione persiste più a lungo vuol dire che l'organismo non si è completamente liberato dalle amebe, e infatti in 3 casi che presentarono questo comportamento assistemmo a recidive. Questo fatto è già stato messo in evidenza da CRAIG il quale insiste sulla necessità di continuare senza ulteriori attese le cure specifiche quando si rilevi un tale comportamento sierologico anche se l'esame delle feci risulta negativo.

Per ciò che si riferisce all'antigene preparato nel modo che abbiamo descritto va notata la buona sensibilità che esso dimostra. Non altrettanto può dirsi per la specificità, in quanto esso è capace di reagire anche con i sieri Wassermann positivi. Questo fatto, non riscontrato da altri AA., ci sembra possa essere spiegato tenendo presente il modo stesso di preparazione dell'antigene; si tratta infatti di un estratto alcolico di un materiale che contiene una grande quantità di cellule della mucosa intestinale e non meraviglia perciò che esso dimostri una reattività più o meno marcata con sieri Wassermann positivi. Però di fronte alla componente aspecifica l'antigene possiede anche una componente specifica, derivata dalla *E. histolytica*, che reagisce solo con i sieri di amebiasici come fanno fede le numerose prove negative ottenute con sieri di soggetti sani o di soggetti sofferenti di malattie intestinali diverse dalla amebiasi. Perciò quando si lavori con antigeni come il nostro la positività della deviazione del complemento presentata dai sieri di amebiasici ha valore solo se i sieri stessi risultano Wassermann negativi. Questo inconveniente non si

verifica, stando ai dati della letteratura, con antigeni preparati da coltura di ameba, per cui l'avvenire di questa reazione sierologica, che dimostra un valore tutt'altro che trascurabile, sarà riservato agli antigeni preparati con tale tecnica pur potendosi ottenere dei buoni risultati con antigeni preparati da muco ricco di amebe prelevato o da pazienti o da cani infettati.

Ci auguriamo che tali ricerche vengano estese in Italia, perchè nel nostro Paese la diffusione della amebiasi è più estesa di quanto comunemente non si creda.

RIASSUNTO

L'A. applica la reazione di deviazione del complemento allo studio sierologico di 63 malati da amebiasi. Usa un antigene preparato secondo la tecnica di Craig e Scott partendo da materiale fecale muco-ematico ricchissimo di amebe. Nota la ottima sensibilità della reazione che risulta positiva in circa il 92% degli amebiasici e l'ausilio da essa fornito nel controllo del trattamento dei malati. L'antigene però reagisce anche con sieri Wassermann positivi per cui le prove hanno valore solo se i sieri in esame risutano negativi alla R. W. Non sono state notate reazioni specifiche con sieri di soggetti non amebiasici, fatta l'eccezione suddetta. L'A. ritiene che lo studio merita di essere esteso possibilmente con l'impiego di antigeni più sensibili e meno aspecifici come quelli ottenuti da AA. americani partendo da colture di *E. histolytica*.

SUMMARY

The author uses the complement-fixation reaction to the serological study of 63 patients affected by *E. histolytica*. The employed antigen was prepared following Craig & Scott's technique, from fecal material, with mucous and blood, very rich in amoebae. The author reports the high sensibility of the reaction which resulted positive in about 92% of all patients, and the help it furnishes in the control of patients' treatment. The antigen, however, reacts as well with Wassermann positive sera; therefore the tests are valuable only if the examined sera are W. R. neg. Non specific reactions were not yet observed with sera of amoeba-free patients, with the above mentioned exception. The author believes that this study is worth to be developed using sensitive and specific antigens as those obtained by american authors, using *E. histolytica* cultures.

RÉSUME'

L'A. employe la réaction de déviation du complément pour l'étude saerologique de 63 patients d'amoebiase. Il se sert d'un antigene preparé suivant la téchnique de Craig e Scott, avec du materiel fécal muco-hematique tres riche en amoebae. Il remarque la grande sensibilité de la réaction, qui est positive dans le 92% des patiens d'amoebiase, et l'aide qu'elle fournit pour le control du traitement des malades. L'antigène réagit aussi avec les serums Wassermann positifs, pourtant les tests sont valuables seulement dans le cas que les serums en examen soient. Wassermann neg. On n'a pas noté de réactions aspécifiques avec serums de patients non amoebiasiques, avec la jàdite exception. L.A. pense qu'il serait bon de poursuivre cet étude en employant possiblement des antigènes plus sensibles et moins aspécifiques, comme ceux obtenus par les AA. américains, partant de cultures d'*E. histolytica*.

LETTERATURA

1) Izar, G.: *Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg.*, *18*, 36, 1914 Beiheft 2.
2) Tribondeau e Ficher: 1916, citati da Quadri.
3) Hage: *Deut. med. Woch.*, *46* (25), 682, 1920.
4) Scalas: citato da Lustig.
5) Lustig, A.: Malattie infettive dell'uomo e degli animali. — Ed. F. Vallardi, Milano, vol. II, 1819, 1922.
6) Quadri, S.: *Atti R. Acc. Fisiocritici*, Siena, *10* (5), 184, 1942.
7) Craig, C. F.: Laboratory Diagnosis of Protozoan Diseases. — Lea e Febiger, Ed., Philadelphia, 1942. (Completo di letteratura per i lavori in lingua inglese dal 1927 al 1942).
8) Rees, C. W. et al.: *Amer J. trop. Med.*, *22*, 581, 1942. (Citati da Kent e Rein).
9) Kent, J. F. e Rein, C. R.: *Science*, *103* (2680), 598, 1946.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

RICERCHE SULLA INFEZIONE DEGLI EMBRIONI DI POLLO CON *PLASMODIUM GALLINACEUM* (I nota)

G. RITA e G. GRAMICCIA

Istituto di Microbiologia della Università di Roma
Direttore: Prof. A. CIMMINO

Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Malariologia
Capo: A. MISSIROLI

Essendo recentemente venuti in possesso degli ultimi dati bibliografici riguardanti la possibilità di infettare embrioni di uccelli con parassiti malarici, ed avendo notato l'intercalarsi di reperti positivi con reperti negativi, abbiamo ritenuto opportuno riprendere le esperienze che uno di noi aveva già eseguito nel 1940 ottenendo sempre risultati negativi, nell'intento di chiarire la ragione di tali discrepanze.

Riferiamo brevemente i dati espressi dalla letteratura nel loro ordine cronologico.

I primi tentativi risalgono al 1935 quando HUFF e BLOOM (1) inocularono senza successo embrioni di canarino con sangue infetto da *P. elongatum*, allo scopo di determinare se le primitive cellule ematiche e i primitivi eritroblasti fossero capaci di essere invasi dai parassiti.

Nel 1938 GAVRILOV e COLL. (2) inoculando sangue di pollo infetto con *P. gallinaceum* «in un vaso dell'allantoide» di embrioni di pollo all'8° giorno di incubazione ottennere costantemente risutati negativi.

Sempre nel 1938 CHORINE (3) sperimentando anch'egli con lo stesso plasmodio non riuscì ad infettare embrioni di pollo fra il 7° e il 16° giorno di incubazione deponendo il materiale infettante sulla membrana chorion-allantoidea messa allo scoperto.

RITA (4) nel 1940 deponendo sangue defibrinato di pollo infetto con *P. gallinaceum* sulla membrana chorion-allantoidea di embrioni di pollo fra il 5° e il 18° giorno di incubazione ottenne costanti risultati negativi.

La WOLFSON (5) nel 1940 ottenne i primi risultati positivi inoculando embrioni di anatra al 7° giorno di incubazione mediante sangue infetto da *P. cathemerium*, *P. elongatum* e *P. lophurae;* per i primi due plasmodi le infezioni furono facili e con carica parassitaria abbondante, per il terzo

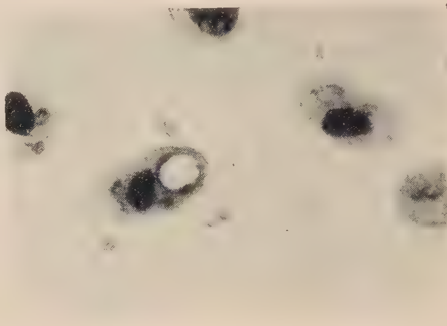


Fig. 1.

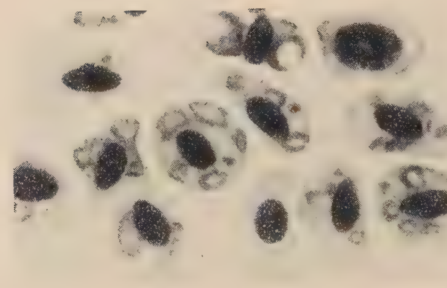


Fig. 2.

scarse e difficili. Essa suppose che il migliore attecchimento delle prime due specie fosse in relazione alla preferenza che esse dimostrano per i globuli rossi non completamente maturi.

Sempre nel 1940, SHORT, MENON e IYER (6) riuscirono ad ottenere una infezione embrionale da *P. gallinaceum* in un solo embrione di pollo infettato al 14° giorno di incubazione mediante apposizione di ghiandole salivari *Aëdes* sulla membrana chorion-allantoidea. Ottennero in tal modo una modesta infezione endoeritrocitaria ed una intensa infezione endoistiocitaria negli organi interni.

Nel 1943 Rodhain e Van den Berghe (7) inoculando sangue infetto da *P. gallinaceum* sulla membrana chorion-allantoidea di embrioni di pollo al 10° giorno di incubazione non riuscirono a determinarne l'infezione.

Invece Fonseca (8) nel 1944 riprodusse l'infezione da *P. gallinaceum* nell'embrione di pollo inoculato con sporozoiti sulla membrana chorion-allantoidea e studiò il ciclo evolutivo degli sporozoiti nelle prime 24 ore, osservando le diverse forme di sviluppo dei parassiti, che si presentarono sempre esoeritrocitici ed intracellulari.

Infine Haas, Bwing e Coll. in una serie di ricerche (9, 10, 11, 12) usando sempre *P. gallinaceum* ed embrioni di pollo al 9° giorno di incubazione riuscirono a riprodurre l'infezione seguendo tre diverse modalità tecniche: *a*) facendo nutrire *Aëdes* infette direttamente sui vasi della membrana chorion-allantoidea; *b*) mediante inoculazione endovenosa nei vasi chorion-allantoidei di sangue parassitato; *c*) mediante inoculazione nel sacco vitellino di una emulsione di cervello di pollo contenente forme endoistiocitarie. Essi rilevarono come la inoculazione di emulsione di cervello contenente forme endoistiocitarie provocasse dopo 10-12 giorni la comparsa di una forte infezione endoistiocitaria, accompagnata da una modesta invasione endoeritrocitaria caratterizzata dal fatto che i parassiti nei globuli rossi non presentavano pigmento neppure negli stati più avanzati del loro ciclo schizogonico. Tale caratteristica veniva mantenuta da parte dei parassiti nei passaggi successivi eseguiti sempre mediante inoculazione di pappa di cervello. Invece gli elementi endoeritrocitari che si sviluppavano sia dalla inoculazione endovenosa di sangue infetto, sia dalla evoluzione degli sporozoiti presentavano il pigmento come di norma.

* * *

Vengono qui esposti i primi risultati delle nostre esperienze tendenti a portare un contributo chiarificatore in questa controversa questione.

Ci siamo serviti di embrioni di pollo dal 9° al 17° giorno di incubazione e di sangue citratato di pollo fortemente infetto da *P. gallinaceum* prelevato da polli privi di forme esoeritrocitiche. Le inoculazioni sono state eseguite sia deponendo 3-4 goccie di materiale in corrispondenza dell'embrione sulla membrana chorion-allantoidea, sia iniettando il materiale nel sacco vitellino nella quantità di circa 1/10 di cc.

Complesivamente sono state inoculate 25 uova, delle quali solo 12 sono giunte a completo sviluppo dell'embrione, mentre le rimanenti 13 hanno subito l'arresto dello sviluppo a diversi periodi della vita dell'embrione. Nes-

suno di questi ultimi ha presentato segni di infezione plasmodiale. Dei 12 embrioni giunti a completo sviluppo, 10 sono risultati sani e due si sono dimostrati infetti. Essi provenivano da uova inoculate al 9° giorno di incubazione, ed erano stati trattati uno con apposizione di sangue parassitato sulla membrana chorion-allantoidea e l'altro con iniezione nel sacco vitellino.

I due pulcini nati infetti hanno subìto una infezione molto grave che li ha portati a morte il 5° giorno dopo la nascita a seguito di una evoluzione progressiva della carica parassitaria nel sangue, che al momento della morte presentava circa l'80-90 % dei globuli rossi infetti. In nessuno dei due pulcini, al momento della morte, si è notata la presenza di forme endoistiocitarie. Per quanto riguarda i parassiti presenti nel sangue, abbiamo notato una notevole abbondanza di gametociti alcuni dei quali si sono anche visti flagellare. Ma ci ha particolarmente colpiti la morfologia delle forme schizogoniche le quali presentavano, particolarmente negli stadi avanzati di sviluppo (grandi trofozoiti, schizonti e rosette), un aspetto caratteristico dovuto alla presenza di un grosso vacuolo centrale a contorni netti, quasi a stampo, nel cui interno si notava il pigmento. La nettezza e la regolarità dei contorni del vacuolo, il pigmento raccolto nel suo iterno, la evidenza particolare del vacuolo negli stadi avanzati della evoluzione del parassita ci fanno pensare che esso rappresenti qualche cosa di diverso dal normale vacuolo di accrescimento del parassita, che si nota sopratutto negli stadi più giovani, e che la sua presenza sia determinata da fattori particolari, legati all'età dell'ospite e alle condizioni chimico-biologiche delle sue cellule ematiche (vedi figg. 1 e 2). D'altra parte la gravità del decorso dell'infezione, la vivace mobilità del pigmento dei parassiti osservati a fresco, la presenza di questa particolare morfologia dei parassiti in tutti e due i pulcini nati infetti, ci fanno escludere la possibilità che i vacuoli siano espressione di una degenerazione dei parassiti.

Allo scopo di stabilire se una tale diversa morfologia si conservasse nelle subinoculazioni, come pure per appurare se il *P. gallinaceum* sviluppatosi nell'embrione di pollo avesse subìto delle modificazioni biologiche, abbiamo eseguito delle subinoculazioni in polli adulti e in pulcini di 6 giorni mediante sangue prelevato dai due pulcini nati infetti all'atto della loro morte. Per quanto ci è possibile riferire a tutt'ora, la morfologia particolare viene perduta nelle subinoculazioni tanto nei pulcini che nei polli adulti; il decorso delle infezioni negli animali subinoculati è stato del tutto equivalente a quello che normalmente si ottiene con parassiti provenienti da polli o pulcini infettati dopo la nascita.

Questi i fatti risultati dall'esperimento.

Se ora noi cerchiamo di renderci conto del perchè i dati nostri nonchè quelli riferiti dagli altri AA. siano così irregolari specialmente per quanto

riguarda la possibilità di trasmettere la infezione da *P. gallinaceum* all'embrione di pollo mediante inoculazione di sangue infetto, siamo portati a considerare tre ordini di fattori che possono influire sull'esito di queste esperienze. Un primo legato alla evoluzione della emopoiesi embrionale del pollo per cui si può supporre che fino a che predomina l'emopoiesi di tipo insulare (5°-7° giorno) l'infezione non riesca ad attecchire. Un secondo riferentesi alla tecnica dell'inoculazioe, per cui l'infezione attecchirebbe solo se si ponga il materiale infettante a contatto diretto con il sangue dell'embrione (inoculazione endovenosa o quei casi di inoculazione sulla membrana chorion-allantoidea nei quali inavvertitamente si sia provocata la rottura di un vasellino embrionale). Però restano difficilmente spiegabili i risultati negativi di GAVRILOCH e COLL., i quali, a quanto ci è dato di capire dal loro lavoro, avrebbero praticato l'inoculazione endovenosa. Infine un terzo ordine di fattori potrebbe essere legato alla razza delle uova inoculate.

Riportiamo a questo proposito che le due uova che siamo riusciti ad infettare nelle nostre esperienze appartenevano ambedue alla razza di polli « Rhode Island ».

Comunicheremo in note successive gli ulteriori risultati delle nostre ricerche, orientate a chiarire tutti questi punti incerti e controversi.

RIASSUNTO

Gli AA. sono riusciti ad infettare due embrioni di pollo al 9° giorno di incubazione mediante apposizione di sangue da *P. gallinaceum* membrana chorion-allantoidea o mediante inoculazione nel sacco vitellino. Notano nei due pulcini nati infetti una particolare morfologia del parassita, che non si mantiene nelle subinoculazioni. Le due uova dalle quali nacquero i pulcini infetti erano della razza « Rhode Island ».

SUMMARY

The authors succeeded in infecting two chicken embrios at te 9th day of incubation by overposition of blood infected with *P. gallinaceum* on the chorio-allantoical membrane, as well as by inoculation into the yolk sack. They note, in the two infected borne cicks, a peculiar morphology of the parasite, that is not mantained in the sub-inoculations. The two eggs wherefrom the infected chicks hatched were « Rhode Island » race.

RESUME'

Les auteurs ont infecté deux embrions de poulet au 9ème jour d'incubation par apposition de sang infecté par *P. gallinaceum* sur la membrane chorion- allantoique aussi que par inoculation dans le sac vitellin. Dans les deux poussins nés infectes on a noté une morphologie particulière du parasite, qui n'est pas maintenue dans les subinoculations. Les deux oeufs dont naquirent les poussins infects étaient de la race « Rhode Island ».

LETTERATURA

(1) Huff C. G. & Bloom W., *Jour. Inf. Diseases*, *57*, 315-336, 1935.

(2) Gavrilov W., Bobkoff G., Laurencin S., *Ann. Soc. Belge de Med. Trop.*, *18*, 429-434, 1938.

(3) Chorine V., *Ann. Inst. Pasteur*, *61*, 829, 1938.

(4) Rita G., Riv. Malariol., *19*, 230-233, 1940.

(5) Wolfson F., Amer, Jour. Hyg., *32*, Sec. C, 60-61, 1940.

(6) Shortt H. E., Menon K. P., Seetharama Iyer P. V., *Ind. Jour. Med. Res.*, *28*, 273-276, 1940.

(7) Rodhain J. & Van Den Berghe L., *Ann. Soc. Belge de Med. Trop.*, *23*, 141-156, 1943.

(8) Fonseca F., *Arquivo de Patologia*, *16*, 434, 1944.

(9) Haas V H., Ewing F. M., *Public Health Reports*, *60*, 185-188, 1945.

(10) Haas V. H., Feldman H. A., Ewing F. M., *Public Health Repostr*, *60*, 577-582, 1945.

(11) Haae V. H., Wilcox A., Davis F. P., Ewing F. M., *Public Health Reports*, *60*, 1945.

(12) Haas V. H., Wilcox A., Ewing F. M., *Jour Nat. Malaria Soc.*, *4*, 279-284, 1945.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

SU UNA CARATTERISTICA BIOLOGICA DEL *CULEX PIPIENS AUTOGENICUS* DI LATINA

Dr. EZIO MOSNA

Istituto Superiore di Sanità — Laboratorio di Malariologia
Capo: Prof. A. Missiroli

L'esistenza nella specie *Culex pipiens* di razze differenti sopratutto per i caratteri biologici, è stata ammessa per il primo da Prell (1912); successivamente da Edwards (1921-1926), da Grassi (1923), da Legendre (1922-1932), da Roubaud (1933).

Quest'ultimo autore ha distinto in Francia due razze di *C. pipiens*: il *C. pipiens pipiens* e il *C. pipiens autogenicus*. Il *C. pipiens pipiens* è incapace di deporre le uova in mancanza di pasti di sangue ed è soggetto ad una pausa invernale obbligatoria. Il *C. pipiens autogenicus* non è invece soggetto all'ibernamento, potendosi mantenere attivo anche nei mesi invernali in condizioni opportune di temperatura; inoltre è capace di maturare le uova senza nutrirsi ed utilizzando unicamente i materiali nutritizi accumulati durante il periodo larvale.

Il *Culex pipiens autogenicus* è stato segnalato, in seguito, anche in Germania, in Ungheria, in Grecia, in Italia. Abbiamo avuto l'occasione di osservare recentemente il *C. pipiens autogenicus* in Latina (Agro Pontino). E' possibile rinvenire i focolai larvali di questa razza nelle acque che hanno invaso gli scantinati di parecchie abitazioni, in seguito alle distruzioni causate dall'ultima guerra. Tali acque in seguito a comunicazioni stabilitesi con fognature, sono ricche di materiali organici e quindi favorevoli allo sviluppo della razza in questione. Durante la lotta contro gli anofeli e le altre specie di Culicidi che si sta attualmente conducendo con l'impiego del DDT nella località suddetta, è stato possibile mettere in rilievo un'interessante caratteristica biologica del *C. pipiens autogenicus* di Latina. Mentre il *C. pipiens autogenicus* proveniente da Massarosa (Toscana) e che manteniamo in allevamento nel nostro Laboratorio da circa

dodici anni è sensibilissimo all'azione del DDT, il *Culex pipiens autogenicus* proveniente da Latina si comporta diversamente.

Infatti, in una prima serie di esperimenti, individui di *C. pipiens autogenicus* del nostro allevamento di Laboratorio e individui di *C. pipiens autogenicus* provenienti da Latina sono stati messi a contatto di porzioni della parete di una stanza intonacata a calce, e trattata con una soluzione al 5% di DDT in petrolio.

Mentre per il *C. pipiens autogenicus* proveniente dal nostro allevamento la mortalità si è verificata nello spazio di 3-5 ore, i *C. pipiens autogenicus* di Latina sono sopravvissuti 32-48 ore. Questi primi esperimenti confermano dunque le nostre osservazioni compiute in natura.

Non è da escludersi per conseguenza la possibilità che sotto la denominazione *Culex pipiens autogenicus* si comprendano due razze distinguibili, per quello che si sa finora, in base al diverso grado di resistenza a una medesima sostanza tossica, cioè il DDT. Ricerche ulteriori potranno meglio chiarire quet'interessante problema.

RIASSUNTO

Il *Culex pipiens autogenicus* di Latina è capace di sopravvivere 32-48 ore all'azione del DDT, mentre il ceppo di *C. pipiens autogenicus* allevato in Laboratorio muore entro 3-5 ore. E' presumibile che si tratti di due razze diverse comprese nella stessa varietà.

SUMMARY

Culex pipiens autogenicus of Latina is able to survive 32-48 hrs. to the action of DDT, while the strain of *C. pipiens autogenicus* bred in Laboratory dies within 3-5 hrs The re are seemingly two different strains within the same variety.

RÉSUME'

Culex pipiens autogenicus de Latina est capable de survivre 32-48 heures à l'action du DDT, tandis-que le *C. pipiens autogenicus* de la souche élevée au laboratoire meurt en 3-5 heures. Il est présumable qu'il s'agisse de deux races différentes comprises dans la même variété.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

SULL'ESISTENZA DI MOSCHE DOMESTICHE RESISTENTI AL DDT

Dott. GIUSEPPE SACCÀ

Istituto Superiore di Sanità
Laboratorio di Marialogia — Capo: Prof. A. Missiroli

Alla fine di maggio di quest'anno, durante un'ispezione in località « Prebenda » (Anzio), trattata sotto la nostra direzione con soluzione di DDT in petrolio al 5 %, a scopo antianofelico, notammo che nelle abitazioni vivevano ancora, indisturbati, numerosi individui di *Musca domestica L.*

Sapendo per esperienza che la irrorazione con DDT porta alla distruzione della massima parte degli insetti domestici, compresa la mosca, dubitammo della esattezza della operazione e provvedemmo a fare irrorare nuovamente le abitazioni suddette, con la stessa soluzione, alla cui preparazione ed al cui spandimento presenziammo.

Quando tornammo pochi giorni dopo per constatare gli effetti del provvedimento, trovammo le mosche in numero uguale, se non accresciuto dall'avanzare della stagione.

Tentammo allora di trovare le cause di questo fatto assolutamente nuovo e potemmo così constatare che le mosche da noi catturate nelle abitazioni della « Prebenda », sottoposte al trattamento con DDT, mostravano una resistenza superiore a quella comune e potevano sopravvivere dopo un contatto di 2-5 ore con l'insetticida, pur avendo dato, in primo tempo, segni di intossicazione.

In seguito accertammo che un'altra località, Bonifica di Torre in Pietra (provincia di Roma), pur accuratamente trattata con il DDT, era infestata da un grandissimo numero di mosche, che in Laboratorio dimostrarono una evidente resistenza all'insetticida, come quelle della « Prebenda ».

A Torre in Pietra una nuova applicazione di DDT, fino a raggiungere

gr. 4 per metro quadrato, portò una tenue riduzione delle mosche, valutabile al 5 % di quelle presenti, mentre nelle altre località trattate contemporaneamente per la prima volta con 1 gr. per metro quadrato della stessa soluzione di DDT s è ottenuta la scomparsa delle mosche.

Le ricerche che continuano tuttora in Laboratorio ci inducono a ritenere che siamo in presenza di una varietà di *Musca domestica* resistente all'azione del DDT, ciò che desta in noi le più grandi apprensioni per l'avvenire.

Considerando che questa varietà di mosca si trova particolarmente diffusa nel delta del Tevere, abbiamo deciso di differenziarla con il nome di *Musca domestica* var. *tiberina.*

RIASSUNTO

Si nota la presenza in alcune località di una varietà di mosca resistente all'azione del DDT. Si propone per essa il nome *Musca domestica* var. *tiberina.*

SUMMARY

The presence in some localities of a variety of fly resistent to DDT action is reported. It is proposed the name *Musca domestica* var. *tiberina.*

RESUME'

On décrit la présence en certaines localités d'une variété de mouche résistante à l'action du DDT. On propose le nom *Musca domestica* var. *tiberina.*

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

INSETTI E VITAMINE

I — Rivista sintetica.
II — Vitamine A ed E nell'*Anopheles labranchiae* var. *atroparvus*

Dr. SERGIO BETTINI e Dr. LEONARDO TENTORI

Istituto Superiore di Sanità

Laboratorio di Malariologia — *Capo: Prof. A. Missiroli*

Laboratorio di Biologia — *Capo: Prof. A. Galamini*

I. — RIVISTA SINTETICA

Esistono nella letteratura tre gruppi di ricerche sulle Vitamine in rapporto con gli insetti. Nel 1° gruppo gli autori si sono occupati delle Vitamine in generale (all'epoca in cui essi esperimentarono, difatti, poco si conosceva delle vitamine in particolare). Essi hanno cercato di stabilire se alcune diete particolari fossero indispensabili agli insetti per il loro normale sviluppo, includendo in queste diede delle sostanze ricche di alcune vitamine allora conosciute. Fanno parte di questo gruppo i lavori di WOLLMAN (1919-1922) il quale cercò di determinare le necessità vitaminiche della *Calliphora vomitoria* sterilizzato a 130° e 134° C. le diete; il lavoro dello stesso A. sulla *Blatella germanica* (1926) in cui si dimostrò la possibilità di allevare 5 generazioni con uova e cibili sterili. Il WOLLMAN quindi concluse che le vitamine non erano strettamente necessarie per lo sviluppo degli insetti.

Seguono gli studi di ZABINSKI (1926-28) sulla *Blatta orientalis* dai quali l'A. trasse la conclusione che non vi è un acceleramento nella crescita di questo insetto se si aggiungono al vitto cibi ricchi di vitamine quali burro, lievito, estratto di crusca o cibi irradiati.

PORTIER (1919) allevò larve di *Tenebrio molitor* con farina sterilizzata a 130°C. e ottenne uno sviluppo uguale rispetto alle larve alimentate con farina non trattata.

PASSERINI (1925) trovò che le larve dello stesso coleottero non si sviluppavano con una farina privata della semola; al contrario lo sviluppo avveniva rapidamente se si aggiungeva una quantità anche piccola di crusca o di altre sostanze contenenti vitamine (tegumento di cariossidi, cicoria, lattuga ed altri vegetali).

Un secondo gruppo più numeroso di ricercatori si è occupato delle singole vitamine (allora conosciute) come parte indispensabile del cibo degli insetti.

Vitamine liposolubili:

Vit. A. — BACOT e ARDEN (1922) sperimentarono sulla *Drosophila* nutrita con burro, e trovarono che questa mosca poteva certamente svilupparsi in presenza anche di piccolissime quantità di Vit. A se non in sua assenza.

Nel 1926 RICHARDSON compì esperimenti molto esaurienti sulle larve di *Ephestia kuehniella*, tarma del grano. Egli notò che il burro ed il tuorlo d'uovo contengono una sostanza che promuove la crescita delle larve e che l'A. ritenne essere la Vit. A.

SWEETMAN e PALMER (1928) riferiscono che il *Tribolium* (Col.) probabilmente ha bisogno di Vit. A o di sostanze analoghe.

KOPÈC (1927) dimostrò che le larve di *Lymantria dispar* nutrite di rami di piante spruzzati con crema di latte (Vit. A) producevano ninfe più piccole del normale.

Vit. D. — Non ci risulta che alcun Autore si sia occupato dell'eventuale azione del fattore D contenuto negli alimenti sullo sviluppo ed accrescimento degli insetti, se si fa eccezione di ZABINSKI (1928) che ha sperimentato sulla *Blatta orientalis* nutrendo questi insetti con cibi irradiati, senza peraltro ottenere risultati differenti dai controlli.

Vit. E. — Anche per quanto riguarda la vit. E non abbiamo trovato nella letteratura nessun specifico riferimento. Dobbiamo però notare che vari AA. hanno ottenuto risultati che dimostravano l'importanza per lo sviluppo negli insetti di una alimentazione contenente sostanze o estratti di sostanze che oggi sappiamo contenere una più o meno alta percentuale di Vit. E.

Le osservazioni di EMERY sulle formiche (*Messor*) che si nutrono in natura del germe dei semi delle erbe, potrebbero oggi interpretarsi come una prova dell'importanza della vit. E nel nutrimento di questo insetto.

E, d'altra parte, è anche da osservare che in tutte le esperienze in cui gli AA. si sono serviti della sterilizzazione degli alimenti per distruggere i fattori vitaminici, essi non hanno superato la temperatura di 140°C. mentre è noto che la Vit. E è termostabile resistendo a temperature fino a 250°C. (Es. WOLLMAN, 1919, due lavori, e PORTIER, 1919).

Complesso Vit. B. — Passando al gruppo delle Vitamine idrosolubili, per quanto si riferisce al complesso B (contenuto nel lievito di birra), accurati ed estesi esperimenti sono stati eseguiti da GUYÉNOT nel 1913, e particolarmente nel 1917. Questo A. adoperò come nutrimento per la *Drosophila ampelophila* varie diete sintetiche con il risultato che nessun alimento artificiale risultò completo se non quando si aggiungevano sostanze contenute nel filtrato autolisato del lievito di birra. L'A. compì anche una serie di ricerche nell'intento di isolare la frazione attiva dall'autolisato, ma senza successo.

Interessanti sono e oservazioni di LOEB, LOEB e NORTHROP (1917) i quali trovarono che le larve di *Drosophila* non potevano crescere su agar-glucosio a meno che non fosse aggiunto del lievito di birra, mentre le mosche adulte si sviluppavano su agar-glucosio puro come su agar-glucosio con lievito. Ciò dimostrerebbe che l'adulto può fare a meno di vitamine che sono invece necessarie per lo sviluppo della larva.

Della stessa *Drosophila* (1922) si sono occupati BACOT e HARDEN che conclusero che questo insetto richiede per il suo sviluppo completo la presenza di Vit. B (lievito) nella dieta.

CHAPMAN (1924) notò che la Vit. B somministrata al *Tribolium confusum,* in aggiunta a destrina, sali, amido, glutine e germe di grano non produceva alcuna variazione dell'accrescimento dell'insetto nei confronti dell'alimentazione normale.

RICHARDSON (1926) in una serie di esperimenti sulle larve di *Ephestia kuehniella,* aventi per scopo l'isolamento dei principî attivi necessari allo sviluppo di queste larve trovò che la farina molto raffinata produceva un accrescimento considerevolmente maggiore se si aggiungeva estratto alcoolico di lievito di birra, deducendo perciò che lo scarso potere di accrescimento della farina risiede, almeno in parte, nel suo basso contenuto di Vit. B; l'A. in base a queste ricerche è arrivato alla conclusione che la quantità di Vit. B necessaria per la crescita normale dell'*Ephestia,* sembra essere contenuta, seppure non interamente, nell'embrione di grano.

Mentre l'ABDERHALDEN (1919) aveva ottenuto delle ninfe molto sviluppate di *Deilephila euphorbiae* nutrendole con piante irrorate con estratto di lievito, al contrario KOPÈC (1927) osservò che somministrando a larve di *Lymantria dispar* estratto acquoso di cuticola di grano, si sviluppavano ninfe più piccole del normale.

ASHNER e RIES (1933) dimostrarono che il *Pediculus* privato dei « micetomi » (gruppi speciali di cellule pieni di microrganismi probabilmente simbionti) viene ad essere menomato nelle sue funzioni di nutrizione e di riproduzione e che questa menomazione può essere, in parte almeno, neutralizzata dall'aggiunta di lievito di birra alla dieta.

Nella letteratura più recente si trovano AA. che cominciano a parlare non più del complesso B. come tale ma dei singoli fattori.

Vit. B 1. — HOBSON (1933) infatti, che ha sperimentato su *Lucilia*, è arrivato alla conclusione che i batteri e il lievito forniscono una vitamina (appartenente al gruppo B) presente nella sostanza cerebrale e non nei muscoli dei vertebrati e che permette lo sviluppo delle larve. Egli provò inoltre che il sangue sterile si dimostra insufficiente e che per un normale accrescimento è necessario aggiungere la vitamina B 1.

Vit. B 2. — Ultimamente GRANDORI (1940) ha ottenuto un aumento di peso delle larve di bachi da seta in confronto con i controlli spruzzando fogile di gelso con Lattoflavina (Vit. B 2) in soluzione.

Ma le ricerche più complete sono state eseguite da TATUM nel 1941. Egli dimostrò che larve di *Drosophila* allevate sterilmente su mezzo di agar contenente aminoacidi, carboidrati, sali ed alcune vitamine, hanno bisogno altresì per la crescita e lo sviluppo completo di tre distinte frazioni di lievito.

Frazione I insolubile in acqua ed alcool: residuo dell'autolisato del lievito.

Frazione II solubile in acqua: estratto alcoolico di lievito di birra secco.

Frazione III solubile in acqua: precipitato con idrato di bario ed alcool degli estratti di lievito.

Gli effetti, sulla nutrizione delle larve di *Drosophila*, di varie combinazioni di queste frazioni sono:

Frazioni I, II, III, separatamente: nessuna crescita.
» I+II oppure I+III: pupazione senza successivo sviluppo.
» I+II+III: sviluppo normale.

Il lavoro di TATUM stabilisce che una combinazione di acido nicotinico, Vit. B 1, B 6 ed acido pantotenico rimpiazza completamente la frazione II.

Questi risultati concordano con quelli di SUBBA ROW e TRAGER (1940) sulle larve di zanzare.

Ancora più recentemente GOLDBERG, DE MEILLON e LAVOIPIERRE (1945) durante studi sui fattori di crescita per la *Aedes aegypti* L. trovarono che l'acido folico era necessario per la trasformazione in ninfe.

Vitamina C. — Riguardo questa vitamina, BACOT e HARDEN (1922) notarono che la *Drosophila* non ha bisogno, per completare il suo sviluppo, di Vitamina C e la stessa constatazione fu fatta da SWEETMAN e PALMER (1928) sul *Tribolium* (Col.).

Un terzo gruppo di ricercatori infine ha voluto stabilire i rapporti fra il contenuto in singole vitamine degli insetti stessi.

In questo campo sono a nostra conoscenza solo i lavori sui bachi da seta in rapporto con la Vit. C di DE CARO e ROVIDA e di MANUNTA nonchè il lavoro di FRANCESCHINI sul contenuto di Vit. A dello stesso insetto. DE

Caro e Rovida (1939) stabilirono che la quantità maggiore di Vit. C per grammo, nei bachi da seta, coincideva con i periodi di più intenso nutrimento (0,3-0,4 mg. di acido ascorbico per gr. di insetto), ma notarono anche che le uova contenevano 0,12 mg. di acido ascorbico per grammo. Gli AA. inoltre riscontrarono che la ghiandola della seta è costantemente ricchissima di Vit. C (0,7 mg. per grammo). Il contenuto di acido ascorbico nell'uovo dello stesso insetto studiato anche dalla Manunta (1940) la quale, usando il metodo del «dibromofenolindifenolo» rilevò un aumento, dal terzo al nono giorno di sviluppo, dopo il quale si aveva una improvvisa caduta. Sia De Caro e Rovida che la Manunta, ammettono che la vitamina C possa essere, sebbene in piccolissima quantità, sintetizzata dal baco e dal suo embrione.

Infine Franceschini (1939) ha dosato il contenuto di Vit. A nelle larve di due razze di baco da seta, a sangue giallo ed a sangue bianco. Secondo l'A. le larve della prima razza contengono 12-14 volte maggiore quantità di Vit. A nei tessuti che non le larve a sangue bianco. Il contenuto di beta-carotene della foglia fresca di gelso è stato di 1,7 mg. per Kg..

Lo scopo dei diversi AA. nelle ricerche di cui abbiamo riferito è stato quello di voler accertare se qualche fattore oligodinamico vitaminico o di altra natura fosse indispensabile per la vita e sviluppo dei singoli insetti oppure che fosse capace di stimolare il loro accrescimento. Essi si sono trovati naturalmente di fronte alla difficoltà di eliminare la possibilità di un apporto di questi fattori, indipendentemente dall'introduzione insieme al nutrimento, da parte di organismi unicellulari (simbionti, ecc.) presenti nel tubo digerente o nelle speciali cellule dette «micetomi».

Gli AA. hanno cercato di eliminare questi organismi sterilizzando i cibi, i terreni di coltura, le uova e perfino le larve; malgrado ciò è rimasto sempre il dubbio che batteri e simbionti non fossero del tutto distrutti e che essi potessero fornire con la loro presenza una probabile, quanto discussa sorgente di fattori ad azione vitaminica.

Wigglesworth difatti nota che i simbionti possono costituire una sorgente endogena di vitamina, e così permettere ad insetti quali *Cimex*, *Glossina* e mosche pupipare che non si cibano durante la loro vita altro che di sangue sterile, di poter vivere e crescere normalmente. Difatti è stato dimostrato sperimentalmente che, se il pidocchio viene privato del suo «micetoma» e dei suoi simbionti, lo sviluppo e la riproduzione vengono altamente menomati, e che questa alterazioni può essere neutralizzata, almeno in parte, con l'aggiunta alla dieta di estratti di lievito.

E' da notare che nessuno dei ricercatori ha mai affrontato questo problema delle vitamine dal punto di vista di una eventuale loro azione su altre condizioni di vita quale per esempio l'ibernamento.

II. — Vitamine A ed E nell'*Anopheles labranchiae* var. *atroparvus*.

Come parte di una serie di lavori sui corpi grassi degli insetti (Culicidi) abbiamo voluto accertare l'eventuale presenza di vitamine liposolubili in questi materiali di riserva.

Ci siamo serviti come materiale di esame di larve di adulti di *Anopheles labranchiae* var. *atroparvus* allevati in laboratorio.

Le condizioni di allevamento sono state le seguenti:

Periodo nel quale sono stati raccolti gli adulti: 10 agosto 1946-30 settembre 1946.

Temperatura media durante il suddetto periodo: 28°C.

Umidità media: 78%.

Le larve sono state allevate in bacinelle di terra cotta usate di continuo per l'uopo e perciò ricoperte all'interno di uno strato spesso di alghe verdi. Il nutrimento è stato sempre tritello di grano piuttosto povero in contenuto di amido, di un'unica provenienza. L'acqua non è stata mai cambiata ma solo mantenuta ad un livello costante con aggiunte periodiche, ed è stata sempre limpida.

Le alate sono state uccise con vapori di cloroformio nello stesso giorno della schiusura di modo che i materiali di riserva erano costituiti sia da quelli immagazzinati dalla larva, tolta quella parte consumata durante la ninfosi, sia da quelli eventualmente sintetizzati in seguito alla istolisi dei muscoli larvali.

Abbiamo compiuto le estrazioni della parte lipidica sulle alate in toto.

In quanto alle larve, le abbiamo prelevate al 4° stadio in procinto di diventare ninfe durante il periodo dal 23 novembre 1946 al 30 gennaio 1947.

Abbiamo privato ogni larva delle seguenti parti: testa, porzione caudale dell'addome, comprendente il 6° segmento, sede costante delle gonadi; tubo digerente comprese i ciechi; la membrana peritrofica con tutto il contenuto alimentare; per cui il materiale di estrazione per le esperienze nel caso delle larve, era formato esclusivamente dai corpi grassi, muscoli, tugumento, e parti trascurabili del sistema nervoso, ,tracheale, ecc...

Abbiamo dovuto limitare il numero delle determinazioni al materiale che è stato possibile raccogliere dall'allevamento nei periodi suindicati.

Tecnica delle estrazioni:

Acceniamo brevemente alle modalità tecniche seguite per la estrazione dei lipidi su cui abbiamo ricercato le vitamine.

Gli adulti e le larve dopo il prelevamento sono stati posti in essiccatori da vuoto e tenuti in ghiacciaia alla temperatura costante di —5°C. dopo avere praticato il vuoto e poi immesso azoto.

Le prove sotto descritte sono state eseguite su materiale perfettamente

essiccato e su di un numero conosciuto di adulti e di larve dopo averne accertato il peso. Il materiale è stato triturato con sabbia di quarzo, quindi posto, in un piccolo ditale estrattore, in Soxhlet. L'estrazione con etere solforico privo di perossidi è stata prolungata per quattro ore. L'etere è stato evaporato nel vuoto a bassa temperatura, e sul residuo pesato sono state eseguite le determinazioni. In un solo caso abbiamo eseguito la determinazione sul residuo insaponificabile dei lipidi di alate femmine.

La prima vitamina che abbiamo presa in considerazione è stata la vitamina A. Le prove qualitative sono state eseguite secondo il metodo colorimetrico di CARR e PRICE sui lipidi estratti.

Si è scolto il grasso in 1 cc. di cloroformio anidro e si è aggiunto 3 cc. di reattivo Carr e Price (soluzione satura di tricloruro di antimonio in cloroformio anidro).

In un secondo tempo, dopo avere accertata la assenza di vitamina A e di sostanza carotinoidi, abbiamo ricercato qualitativamente e quantitativamente la vitamina E secondo il metodo colorimetrico di EMMERIE e ENGEL anche questa volta direttamente sui lipidi estratti eccetto in una ultima prova nella quale la determinazione come già accennato, è stata eseguita sul residuo insaponificabile.

La vitamina veniva estratta dai lipidi con alcool assoluto, quindi si centrifugava ed il liquido limpido si versava in un palloncino tarato da 25 cc. In camera oscura si aggiungevano prima cc. 1 di cloruro ferrico (soluzione in alcool etilico assoluto al 0,2 %) e poi cc. 1 di alfa-dipiridile (soluzione in alcool etilico assoluto al 0,5 %) si portava a volume a cc. 25 con alcool assoluto. La lettura si faceva dopo 10 minuti al fotometro di ZEISS PULFRICH usando vaschette da 1 cc. e filtro S 50.

Il fattore di estinzione (E) del colore dell'alfa-tocoferolo puro con il reattivo può essere dato dalla seguente formula:

$$E \quad \frac{100\ \gamma}{1\ \text{cm.}}\ 25\ \text{cc.} = 0{,}146$$

Per la saponificazione abbiamo seguito il seguente procedimento: i lipidi ottenuti venivano trattati con 2 cc. di KOH sol. 2N in alcool metilico assoluto in bagno maria per 10' alla temperatura di 75° C in palloncino con refrigerante a ricadere. Al termine della saponificazione si aggiungevano 8 cc. di alcool metilico assoluto e 10 cc. di acqua distillata. In un imbuto separatore si estraevano 3 volte con 30 cc. di etere privo di perossidi. Gli estratti eterei riuniti venivano lavati con acqua, poi con soluzione di KOH al 2 %, e quindi nuovamente con acqua fino a reazione neutra. L'estratto etereo veniva quindi essiccato su solfato di sodio calcinato. Evaporato l'etere nel vuoto, il residuo veniva raccolto con una piccola quantità di alcool assoluto per 3 volte e versato in un palloncino tarato di 25 cc.

In un terzo tempo abbiamo eseguito determinazioni della Vit. A e della Vit. E sul tritello di grano usato per l'alimentazione.

I risultati dei nostri esperimenti sono riassunti nella tabella seguente.

TABELLA I

N.° Adulti	Peso	Peso dei lipidi estratti	Determinazione qualitativa Vit. A.
496 ♀	gr. 0,6522	gr. 0,0610	assente
396 ♀	» 0,3567	» 0,0402	»
300 ♀	» 0,1438	» 0,0491	»
300 ♂	» 0,0953	» 0,0102	»

TABELLA II

N.° Adulti	Peso	Peso dei lipidi estratti	Determinazione quantitativa Vit. E	% Vit. E sui lipidi
300 ♀	gr. 0,1464	gr. 0,0591	γ 58,45	0,098
300 ♀	» 0,1446	» 0,0482	γ 54,79	0,11
300 ♀	» 0,1458	» 0,0386	γ 56,80	0,14
300 ♂	» 0,0876	» 0,0128	assente	—
1500 ♂	» 0,5412	» 0,0456	γ 68,49	0,15
300 ♀	» 0,1441	» 0,0470	γ 582 (1)	1,23
N.° Larve				
300	—	» 0,0244	20,50	0,08
1000	—	» 0,0510	102,74	0,20

(1) La determinazione in questo caso è stata eseguita sul residuo insaponificabile del grasso estratto.

TABELLA III

Tritello di grano essiccato	Lipidi estratti	Determinazione vitamine	% Vit. E sui lipidi
gr. 5,0032	gr. 0,1011	Vit. A qualitativamente assente	—
» 5,1710	» 0,1176	Vit. E = γ 287	0,24

DISCUSSIONE

Premesso che il numero delle prove è ancora scarso per potere interpretare i fatti osservati, ci limitiamo a fare alcune considerazioni sui risultati ottenuti.

Tab. I. — La determinazione qualitativa della Vit. A, in 3 prove con adulti femmine ed in una prova con adulti maschi, ha dato sempre risultati negativi.

Tab. II. — Partendo da un numero fisso di adulti femmine (300), da cui si estraeva una quantità di lipidi pressochè uguale, abbiamo trovato un contenuto medio di Vit. E all'inicrca costante, γ 56,68, e cioè 0,116 % sui lipidi. Nel solo caso in cui la determinazione è stata eseguita sul residuo insaponificabile dei lipidi estratti, abbiamo ottenuto una quantità di vit. E considerevolmente superiore, circa 10 volte (1,23 %). Per spiegare il differente risultato ottenuto sui lipidi estratti con etere da quello ottenuto sulla frazione insaponificabile di essi, si può pensare che la vit. E, presente nei lipidi, sia in parte legata a sostanza che le impediscono di essere individuata.

La quantità di lipidi ricavata da 300 maschi è stata di molto inferiore (gr.0,0128), da quella ricavata dallo stesso numero di femmine per cui abbiamo ripetuto la determinazione su 1500 adulti femmine che ci hanno fornito gr. 0,0456 di lipidi, con un contenuto di vit. E di γ 68,49, e cioè un % (0,15) sui lipidi estratti pressochè uguale al % di vit. E determinato sui lipidi delle femmine adulte.

I dosaggi sui lipidi delle larve hanno dato risultati assai differenti che data la scarsità materiale a disposizione non è stato possibile chiarire: 20,50 γ (0,08 %) di vit. E su un lotto di 300 larve e poi 102,70 γ (0,20 %) di vit. E su un secondo di 1000 larve. Tuttavia i dati sono qui riferiti perchè comunque essi indicano la presenza di vit. E nelle larve.

Tab. III. — Mentre la vit. A risulta assente dai lipidi estratti dal tritello di grano, la determinazione quantitativa della vit. E sul grasso estratto dallo stesso tritello ha dato un contenuto di 0,24 %.

Poichè il contenuto di vit. E nel germe di grano è uguale sia dosandolo sui lipidi estratti come tale sia sul residuo insaponificabile, risulta che il % di vit. E nel residuo insaponificabile degli adulti femmine è 5 volte maggiore di quello del tritello di grano. Questo farebbe pensare ad un accumulo di vit. E nel corpo dell'insetto in seguito alla combustione dei grassi ai fini energetici e ad un deposito della vitamina non utilizzata.

La provenienza della vit. E sembrerebbe quella alimentare se consideriamo che il tritello di grano, su cui le larve si sono nutrite, ne è ricco.

Avendo escluso dalle estrazioni tutti quegli organi larvali che potevano contenere una più o meno alta quantità di vitamine, ed il cibo contenente vitamine, e considerando che gli adulti esaminati non si erano ancora nutriti, possiamo giustamente pensare che sia il grasso contenuto nel corpo adiposo il veicolo di questa vitamina. A meno che non si voglia pensare che tutta la vitamina o parte di essa sia presente nei muscoli larvali, nel qual caso essa verrebbe liberata durante la istolisi dei muscoli larvali. Come questa nella larva passi attraverso le pareti del tubo digerente e come essa venga deposta nel corpo grasso, o eventualmente nei muscoli, non siamo ancora in grado di precisare.

CONCLUSIONI

1) La vit. A non è presente nei lipidi estratti da adutli maschi e femmine di *A. labranchiae* var. *atroparvus*.

2) La vit. E è presente nei lipidi estratti da adulti maschi e femmine, e da larve dello stesso anofele. La quantità % media di vit. E è di 0,116. Nel caso della determinazione eseguita sul residuo insaponificabile dei lipidi estratti da femmine adulte il % è stato di 10 volte circa più elevato, e cioè 1,23 %.

3) Il contenuto di vit. E del tritello di grano dato come nutrimento alle larve in esperimento è stato di 0,24 %, mentre la vit. A è risultata assente.

4) Questi dati farebbero pensare ad un accumulo di vit. E di origine alimentare nel corpo grasso degli anofeli.

Nota: Ringraziamo il Dr. G. Pruner che ci ha consigliato il metodo per la determinazione della Vit. E e che ha collaborato con noi per la lettura al fotometro di Pulfrich.

RIASSUNTO

Nella prima parte gli AA riportano una rivista sintetica dei lavori che si conoscono sulle vitamine in rapporto con gli insetti.

Nella seconda parte essi hanno ricercato le Vit. A ed E, con i metodi colorimetrici rispettivamente di Carr e Price e di Emmerie-Engel, nei lipidi estratti dalle larve e dagli adulti ♂ e ♀ di *Anopheles labranchiae* var. *atroparvus*. Le larve in esperimento sono state nutrite con tritello di grano.

La Vit. A è risultata assente, mentre è stata dimostrata la presenza della Vit. E nelle larve e negli adulti ♂ e ♀ dell'anofele considerato. La Vit. E dosata sul residuo insaponificabile è stata 10 volte maggiore che non quella dosata direttamente sui lipidi. Dato che il contenuto di Vit. E dei lipidi del tritello di grano, usato come nutrimento, è stato di 0,24 %, mentre il contenuto di Vit. E del residuo insaponificabile dei lipidi estratti da ♀ adulte è stato di 1,23 % gli AA. suppongono che le Vit. E dosata negli anofeli sia di origine alimentare, e si accumuli nel corpo grasso degli anofeli.

SUMMARY

In the first part of this paper the AA report a synthetic review of all known works on vitamins related to insects.

In the second part they tested for vitamins A and E, using Carr an Price, and Emmerie-Engel colorimetric methods, the lipidis extracted from larvae and adults ♂ and ♀ of *A labranchiae* var. *atroparvus*. The larvae under experiment were fed with bran of wheat.

Vitamin A was absent, while Vit. E was present in larvae and adults ♂ and ♀ of the above mentioned mosquito. The content of vit. E, determined on the unsaponifiable matter, has been 10 times greater than that determined on the lipids extracted with ether. Since the content of Vit. E of bran lipids used as nutrition, has been 0,24%, while the content of Vit. E of lipids (unsaponifiable matter) from adults ♀ has been 1,23%, the AA. tink that the Vit. E content of this mosquito may originate from larval food and may accumulate in its fat body.

RÉSUME'

La prémière partie de ce travail est une revue synthetique des travaux connus sur les vitamines en rapport avec les insectes.

Dans la seconde partie, les AA. ont recherché par les méthodes colorimétriques de Carr & Price et de Emmerie-Engel les Vit. A et E dans les lipides extraits des larves et des adultes ♂ et ♀ d'*Anopheles labranchiae* var. *atroparvus*. Les larves ont été nourries avec du petit son.

On n'a pas trouvé de Vit. A, tandis que la Vit. E a été démonstrée soit dans les larves que dans les adultes ♂ et ♀ de l'anopheles étudié. La Vit. E, qu'on a dosé sur le residue insaponifiable, a été 10 fois plus que celle dosée directement sur sur lipides. Etant donné que le contenu en Vit. E des lipides du petit son qu'on a employé comme nourriture, a été de 0.24%, tandis que le contenu en Vit. E du residu insaponifiable des lipides extraits des adultes ♀ a été de 1,23%, les AA. supposent que la Vit. E trouvée dans les anopheles soit d'origine alimentaire et que elle s'accumule dans les corps graisses des anopheles.

LETTERATURA

ABDERHALDEN K., *Arch. ges. Physiol. 176*, 236-262, 1919 (da Uvarov).
ASCHNER M., RIES E., *Z. Morph. Oekol. Tiere, 26*, 529-590, 1933 (da Wiggleswort).
BACOT A. W., HARDEN A., *Biochem. J., 16*, 148-152, 1922 (da Uvarov).
CARR E PRICE, *Bioch. J., 20*, 497, 1926.
CHAPMAN R. N., *J. Gener. Physiol. 6*, 565-585, 1924. (da Uvarov).
DE CARO L., ROVIDA E., *Quad. della Nutriz., 6*, 91, 1939.
EMERY C., *Rendic. Acad. Sci. Bologna, 16*, 107-117, 1912 (da Uvarov).
FRANCESCHINI J., *Quad. della Nutriz., 6*, 87, 1939.
GOLDBERG, DE MEILLON, LAVOIPIERRE, *J. Exper. Biol. 21*, 90, 1945.
GRANDORI L., GRANDORI R., *Ric. Sci. Prog. Tecn. Econom. Naz., 11*, 175-178, 1940.
GUYÉNOT E., *C. R. Soc. Biol., 74*, 97, 178, 223, 270, 332, 389, 443, 1913 (da Uvarov).
GUYÉNOT E., *Bull. Biol. Belg, 51*, 1-330, 1917 (da Uvarov).
HOBSON, R. P., *Biochem. J., 27*, 1899-1909, 1933 (da Wigglesworth).
KOPEC S., *Biologia Generalis 3*, 375-384, 1927 (da Uvarov).
LOEB J., *Science, 41*, 169-170, 1915 (da Uvarov).
LOEB J., NORTHROP J. H., *J. Biol. Chem., 27*, 309-312, 1916 (da Uvarov).
MANUNTA C., *Studi Sassar., 18*, 91-94, 1940.
PASSERINI N., *Atti R. Acad. Lincei, Rendic., Sez. VI, 1*, 58-59, 1925.
PORTIER P., *L. c.*, 82, 59-60, 1919 (da Uvarov).
RICHARDSON CH. H., *J. Agric. Res., 32*, 895-929, 1926 (da Uvarov).
SUBBA ROW E TRAGER, *J. Gen. Physiol., 23*, 561, 1940.
SWEETMAN M. D., PALMER L. S., *J. Biol. Chem. 77*, 33-52, 1928 (da Wigglesworth).
TATUM, *Proc. Nat. Ac. Sc., 27*, 193, 1941.
UVAROV B. P., *Trans. Entom. Soc. London, 76*, 314-318, 1929.
WIGGLESWORTH V. B., *Insect Physiology, Methuen e Co. Ltd., London* 1934.
WOLLMAN E., *C. R. Soc. Biol. 82*, 593-594, 1919 (da Uvarov).
WOLLMAN E., *C. R. Soc. Biol., 82*, 1208-1210, 1919 (da Uvarov).
WOLLMAN E., *Ann. Ist. Pasteur, 36*, 784-788, 1922 (da Uvarov)
WOLLMAN E., *C. R. Soc. Biol., 95*, 164-165, 1926 (da Uvarov).
ZABINSKI J., *C. R. Soc. Biol., 94*, 545-548, 1926 (da Uvarov).
ZABINSKI J., *L. c., 98*, 73-77, 1928 (da Uvarov).
ZABINSKI J., *L. c., 98*, 78-80, 1928 (da Uvarov).

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. VIII - N. 2-3 - Giugno-Settembre 1947

RIDUZIONE O ERADICAZIONE DEGLI ANOFELI?

Prof. A. MISSIROLI

Istituto Superiore di Sanità — Laboratorio di Malariologia

A causa delle inondazioni provocate a scopo bellico nell'autunno 1943, le aree depresse del litorale tirrenico ritornarono allo stato paludoso. Siccome questi terreni costituiscono antichi fondi marini ricoperti da uno strato più o meno profondo di terreno alluvionale, prevedemmo che il cloruro di sodio sottostante avrebbe raggiunto per diffusione l'acqua stagnante alla superficie, determinando quel tenue grado di salinità che è necessario per far prevalere l'*A. labranchiae* sulle specie innocue contendenti.

Considerando poi che il numero degli anofeli è in rapporto diretto con la estensione della superficie idrica, fu facile prevedere un grande sviluppo dell'*A. labranchiae labranchiae* che avrebbe tentato di colonizzare le aree circostanti, diffondendo la malaria anche nelle zone salubri, come avvenne ogniqualvolta le vicende storiche sconvolsero l'Agro Romano.

Di fatti, nella primavera successiva (1944), studiando la composizione chimica delle acque delle zone inondate di Maccarese, osservammo un contenuto di cloruro sodico di 0,2-0,3%, e nell'estate successiva constatammo che in alcune zone l'*A. labranchiae* aveva completamente sostituito le sottospecie di *A. maculipennis* preesistenti, e si era diffuso ovunque raggiungendo i sobborghi di Roma. Deducemmo da ciò che quando compaiono condizioni sfavorevoli ad una specie, ma tollerabili per le specie contendenti, la regressione numerica e la successiva sparizione di una specie non avviene per gradi; il mutamento dei caratteri del biotopo costituisce spesso una catastrofe per la specie perdente.

Nella tabella che segue sono riassunti i risultati delle ricerche compiute nel nostro laboratorio sulle razze di *A. maculipennis* a Maccarese nel 1939 ed i risultati di analoghe ricerche compiute nell'estate 1944 (1).

(1) La Face L. (1939) « Sull'anofelismo della bonifica di Maccarese ». *Rend. Ist. San. Pubbl.*, *2*, 213-219.

Località di cattura	Percentuale di *A. labranchiae labranchiae* 1939	Percentuale di *A. labranchiae labranchiae* 1944
Centro 31	45,4	96
Centro 32	28,6	100
Centro 33	48.0	97

La grande estensione della superficie idrica e le operazioni belliche che si svolsero in quelle regioni fino ai primi giorni del giugno (1944), impedirono l'applicazione di efficaci misure profilattiche, per cui la malaria divampò come nei tempi più oscuri del medio evo. L'ampiezza del fenomeno può essere dimostrata dal grafico che riproduco, che riassume il numero dei casi di malaria denunciati nell'Agro Pontino.

La grave epidemia determinò la costernazione dei coloni e destò giusta preoccupazione nelle autorità sanitarie che mi incaricarono di studiare le misure atte a fronteggiare il male.

Dopo aver considerato i mezzi di cui potevamo disporre, rassicurai la Direzione della Sanità Pubblica sulle possibilità di restituire prontamente la salubrità e la prosperità alle zone invase dalla malaria, e, in una conferenza pubblica (2) tenuta a Roma il 16 novembre 1944 destinata a rassicurare il pubblico ansioso, così concludevo: «Mentre nei tempi passati l'attuale invasione di malaria avrebbe costituito l'inizio di una lunga serie di epidemie devastatrici che avrebbero portato la desolazione nell'Agro Romano per diversi secoli, oggi siamo in grado di assicurare che entro pochi mesi la malaria sarà ricondotta entro i limiti in cui si trovava prima della guerra, e che nel prossimo anno (1945) nessun caso di malaria primitiva turberà la serenità del popolo romano nel Lido di Ostia».

I numerosi problemi demografici, economici e sociali derivanti dalla sconfitta mi indussero poi a riconsiderare in quell'occasione il problema del risanamento radicale del nostro Paese, che avrebbe permesso lo sviluppo agricolo di vaste aree dell'Italia centro-meridionale e, nella stessa conferenza (16 novembre 1944), così preannunziavo il prossimo inizio della grande impresa: «La nostra aspirazione non si limita più a ridurre il numero delle nuove infezioni ed a curare i malarici; oggi tendiamo a liberare l'Italia da questa malattia, consapevoli che i mezzi scientifici di cui disponiamo ci permetteranno di raggiungere lo scopo in un tempo assai breve.

Con la lotta antilarvale e contro l'insetto adulto noi tendiamo a ridurre il numero degli anofeli al disotto del punto critico necessario per trasmettere la malaria; intensificando queste misure noi possiamo giun-

---

(2) Missiroli A. (1944) «La malaria nel 1944 e misure profilattiche previste per il 1945». *Rend. Ist. Sup. San.*, 7, 616-642.

gere alla eliminazione di una specie da un'area determinata, cioè eradicare gli anofeli vettori dell'infezione malarica come hanno dimostrato recentemente il dr. Soper, della Fondazione Rockefeller, ed i suoi collaboratori.

L'*A. gambiae,* che è il più temibile vettore di parassiti malarici che esista nel mondo, spinto dall'istinto della dominazione dello spazio, comune ad ogni specie animale, profittò delle invenzioni del genio umano per emigrare in Brasile ove, per mezzo di un aeroplano, atterrò — sconosciuto — fra il 1929 ed il 1930. Nel 1930 Shannon scoprì la presenza dell'*A. gambiae* in Brasile e da ogni parte si gridò all'allarme. Intanto l'*A. gambiae* si diffuse rapidamente nelle regioni vicine, e nel 1938 si era diffuso sopra un'area vasta quanto un terzo dell'Italia, producendo gravissime epidemie che, progredendo, avrebbero minacciato la prosperità ed il progresso di tutte le regioni dell'America centro-meridionale. Fu allora deciso dal governo brasiliano di eradicare l'*A. gambiae* dal Brasile, e per tale scopo fu chiesta la collaborazione della Fondazione Rockefeller che in due anni riuscì ad eliminare dal suolo americano questo pericoloso insetto. A sua volta il governo egiziano nel 1944 invocò la cooperazione della Fondazione Rockefeller per sospingere verso le regioni etiopiche l'*A. gambiae* che aveva invaso l'alto Sudan producendo danni incalcolabili; ancora una volta la scienza riuscì a dominare l'*A. gambiae,* ed in sette mesi l'opera di eradicazione era compiuta. Nel 1946 noi ci accingeremo ad eradicare l'*A. labranchiae labranchiae* e l'*A. elutus* dalla Sardegna, ma dobbiamo prevedere che la eradicazione di zanzare indigene costituirà un'opera ben più ardua della eradicazione di anofeli emigrati nelle zone periferiche del loro centro genetico.

Ogni specie animale o vegetale ha un centro genetico, che presenta le condizioni più favorevoli per lo sviluppo della specie e per la sua evoluzione; da questo centro geografico di origine ogni specie si è diffusa nel mondo spontaneamente o per opera dell'uomo, man mano che lo permisero le sue attitudini a diffondersi e le sue possibilità di esistenza.

Nel centro genetico si osserva una grande concentrazione di varietà e di forme sistematiche fra loro divergenti; invece man mano che ci allontaniamo in tutte le direzioni dal centro genetico si nota una diminuzione del numero delle forme sistematiche ed un impoverimento dei caratteri del loro patrimonio genetico (3).

Pertanto, mentre nel centro di dispersione di una specie si riscontrano biotipi dotati di caratteri biologici differenti che li rendono atti a resistere in misura differente alle cause tendenti a limitare lo sviluppo della specie, man mano che ci allontaniamo dal centro d'origine si osserva una diminuzione del numero delle forme sistematiche, per cui le

(3) CHIARUGI A. (1939) « L'eredità in patologia vegetale ». *Atti IV congresso Internazionale di Patologia Comparata, 1,* 155.

cause distruttive — nemici, concorrenti e gli stessi agenti atmosferici — possono avere una influenza deleteria sulla specie, perchè agiscono sopra una popolazione pressochè uniforme nella costituzione genetica riguardante la resistenza alle varie cause distruttrici ambientali. Da ciò si deduce che la presenza di una specie alla periferia della sua area di dispersione può divenire precaria, e che il suo controllo e la sua eradicazione per opera dell'uomo è agevolata da queste condizioni.

Le considerazioni suesposte assumono maggior valore quando si voglia controllare l'invasione di un insetto derivante dalla moltiplicazione di pochi individui emigrati fuori dell'area di dispersione: alludo alla eradicazione dell'*A. gambiae* dal Brasile, che costituisce inndubbiamente un grande successo, ma non siamo in grado di attribuire questo successo unicamente all'opera dell'uomo.

Meno probativa, per quanto riguarda la possibilità di eradicazione di una specie anofelica, è stata la eliminazione dell'*A. gambiae* dall'Egitto. Ogni specie tenta ogni anno di colonizzare le zone circostanti l'area di dispersione; favorevoli condizioni climatiche e temporanee modificazioni ambientali possono permettere temporanee invasioni in aree vicine, ma di regola la specie rientra spontaneamente nell'area millenaria di dispersione, determinata in tempi lontani dalla lotta per la conquista dello spazio.

E' presumibile quindi che l'invasione dell'Egitto da parte dell'*A. gambiae*, avvenuta nel 1942, non sia un fenomeno singolare e che questo insetto sarebbe ritornato spontaneamente entro i suoi confini, come certamente ha fatto dopo analoghe incursioni compiute nei secoli passati.

I brillanti risultati conseguiti dal dott. Soper e dal dott. Wilson creano quindi la necessità di tentare la eradicazione di anofeli nel loro centro di dispersione e perciò, con l'approvazione del Direttore Generale della Sanità Pubblica, tenteremo nel 1946 l'eradicazione dell'*A. labranchiae labranchiae* dalla Sardegna.

L'*A. labranchiae labranchiae* è la specie dominante nelle zone pianeggianti dell'Italia meridionale ed insulare e, dal numero di varietà che presenta in quella regione, si deve ritenere che costituisca il centro genetico di dispersione della specie. Questa specie comparve indubbiamente molti milioni di anni fa, quando le Alpi erano appena in formazione e fra l'Europa e l'Africa si estendeva un'immensa pianura interrotta soltanto dai bagliori dei vulcani della Sardegna; successivi cambiamenti tellurici hanno interrotto la superficie di dimora di questa specie, che in origine era dispersa su di un territorio continuo. Possiamo quindi a ragione considerare la Sardegna come una parte del centro di dispersione dell'*A. labranchiae labranchiae*, e perciò la eradicazione di questa specie da que-

st'isola avrà una cospicua importanza scientifica e pratica per il nostro Paese, anzi per l'umanità.

Si trovano in Sardegna tre anofeli vettori di malaria: l'*A. labranchiae labranchiae*, l'*A. sacharovi* (*elutus*) e l'*A. superpictus*.

L'*A. sacharovi* non riesce a contendere lo spazio all'*A. labranchiae labranchiae* nel suo centro genetico, e perciò è rappresentato in Sardegna da pochi individui; ma se eradicheremo l'*A. labranchiae labranchiae*, siccome nessuno spazio nel mondo rimane privo di vita, l'*A. sacharovi* occuperà subito i posti lasciati liberi dall'*A. labranchiae labranchiae*, e vedremo la malaria divampare più grave di prima. Occorre quindi eradicare completamente l'*A. labranchiae labranchiae* e l'*A. sacharovi*, la quale cosa è agevole perchè le due specie si contendono lo stesso biotopo. L'area lasciata libera da queste due specie verrà occupata dalle varietà innocue di *A. maculipennis*, e con ogni probabilità dall'*A. maculipennis messeae*.

L'*A. superpictus*, l'anofele delle zone montane, non può contendere lo spazio all'*A. maculipennis*, e d'altro canto anche nelle zone montane della Sardegna non riesce a sviluppare che un numero esiguo di individui.

Come ho detto, i nostri amici americani eliminarono in pochi mesi l'*A. gambiae* dall'Egitto e in due anni eradicarono lo stesso anofele dal Brasile: noi riteniamo che la eradicazione dell'*A. labranchiae labranchiae* dalla Sardegna richieda maggior tempo, e che in tre anni appena si possa assicurare il successo. Si potrà allora iniziare la eradicazione dell'*A. labranchiae labranchiae* dalla Sicilia e successivamente dall'Italia centro-meridionale. Si delinea pertanto la possibilità di eradicare dal suolo d'Italia l'infezione malarica che per venti secoli ebbe un'influenza funesta sullo sviluppo e sulla prosperità del nostro Paese ».

Da quanto esposi nel 1944 si può desumere che ritenevo possibile l'eradicazione del'*A. labranchiae labranchiae* dall'Italia centro-meridionale e dalle isole, ma che consideravo l'impresa assai più difficile e costosa di quanto non fosse stata l'eradicazione dell'*A. gambiae* dal Brasile e dall'Egitto.

Ma in quel tempo non rimaneva a noi altra possibilità nota per risanare l'Italia, per cui non esitai a raccomandare l'esperimento di eradicazione dell'*A. labranchiae labranchiae* in Sardegna, dove avremmo dovuto fare la nostra esperienza per aggredire successivamente il problema del risanamento dell'Italia continentale.

L'esperimento da me proposto venne affidato agli esperti della Fondazione Rockefeller che avevano già eliminato l'*A. gambiae* dal Brasile e dall'Egitto affinchè i risultati che si conseguissero in Sardegna fossero comparabili con quelli già conseguiti altrove.

I nostri amici americani iniziarono subito nel 1946 estese ricerche preliminari sugli anofelini della Sardegna confermando le mie previsioni teoriche. Fu difatti constatata la presenza di due varietà di *A. labranchiae*

labranchiae, differenziabili per i caratteri delle uova, come era stato messo in evidenza dai miei collaboratori per l'Italia meridionale (4), e fu riscontrato lo sviluppo dell'*A. labranchiae labranchiae* in pianura ed in montagna fino a 1000 metri, per cui è da presumere che esistano varietà biologiche atte a vivere a differenti altitudini.

I risultati di queste ricerche confermano le previste difficoltà dell'impresa,che sarà ugualmente affrontata essendo necessario conoscere se è possibile e quanto costa l'eradicazione di una specie dal suo centro di dispersione.

Per conseguire l'eradicazione di una specie anofelica si cerca di colpire l'anofele in tutti gli stadi del suo sviluppo e perciò attualmente in Sardegna la lotta antilarvale è integrata dalla lotta contro l'insetto adulto.

Il lavoro di eradicazione degli anofeli malarigeni in Sardegna, iniziato nel gennaio 1947, avrà la durata di due anni e richiederà una spesa di due miliardi.

Se l'opera di eradicazione dovesse richiedere un tempo superiore a tre anni, si può considerare l'esperimento come fallito, poichè in tal caso la eradicazione diverrebbe un'operazione troppo costosa.

Insetticidi e lotta contro gli anofeli.

Durante trenta anni abbiamo esplorato tutte le vie per risanare il nostro Paese dalla malaria; tentammo dapprima (1919-1921) una rigorosa applicazione del metodo KOCH, basato sul risanamento radicale dell'individuo malarico, senza ottenere alcun successo profilattico. Si era fatto troppo assegnamento sulle possibilità di estendere la ricerca microscopica, sulla esattezza e sul rendimento pratico di questa ricerca e sopratutto sulla possibilità di curare radicalmente i malarici.

Comprendemmo allora (1922) che *la profilassi della malaria costituiva un problema entomologico*, per cui rivolgemmo le nostre ricerche allo studio della biologia degli anofeli ed ai mezzi idonei per combatterli allo stato larvale ed allo stato adulto.

Tentammo dapprima la lotta antilarvale, ma in quel tempo il larvicida più economico era il petrolio che per noi era troppo costoso. Perciò il nostro esperimento, esteso ad una zona ristretta attorno a Nettuno, servì solo a dimostrare l'impossibilità di estendere a tutta l'Italia questo metodo profilattico che aveva tanto contribuito a risanare la zona del canale del Panama.

Tentammo allora la lotta contro l'insetto adulto durante il periodo invernale per eliminare o ridurre il numero degli anofeli ibernanti a cui era affidato il compito di moltiplicare la specie nella stagione successiva.

(4) LUPASCU G. (1941) « Su alcune variazioni delle uova di *A. maculipennis* var. *labranchiae* ». *Riv. Parassitol.*, 5, 121-125.

Si partì dala cognizione che da una sola zanzara ibernante possono derivare, nelle successive generazioni, molti milioni di anofeli, e che perciò la distruzione di un anofele ibernante corrisponde alla distruzione di molti milioni di anofeli durante la stagione estiva. Ma il calcolo era fallace, perchè nessuno spazio vitale rimane privo degli esseri viventi che in esso trovano favorevoli condizioni di sviluppo, perciò lo spazio liberato dagli anofeli ibernanti fu presto occupato degli anofeli delle regioni vicine, portati incessantemente ad estendere la loro area di dimora. Oltre a ciò si deve considerare che, di regola, per ogni specie sopravvive durante la pausa invernale un numero di individui assai superiore a quello necessario per il mantenimento della specie: per cui, quando anche fosse



Fig. 1.

praticamente possibile distruggere il 90 % degli anofeli ibernanti arrecheremmo un danno previsto dalla natura.

Difatti la distruzione invernale degli anofeli da noi eseguita nei pressi di Nettuno (1922) ci cagionò una delusione inattesa. Molto e faticoso fu il lavoro invernale; le case e le capanne furono trattate con acido cianidrico e per impedire che il gas sfuggisse dalle capanne, queste venivano ricoperte con una grande tenda adattata a questo scopo, come si può osservare nella fotografia che riproduco.

Attendemmo con ansia i risultati; effettivamente nel mese di maggio il numero degli anofeli catturati nei casolari trattati, era di gran lunga inferiore a quello dei casolari tenuti per controllo, ma nel mese di giugno la natura aveva già ristabilito l'equilibrio biologico preesistente e gli anofeli apparvero numerosi come nella regione circostante.

Allora riprendemmo la lotta contro gli anofeli adulti durante il periodo epidemico.

La distruzione degli anofeli negli ambienti occupati dall'uomo ha due scopi:

a) impedire che anofeli infetti pungano l'uomo;

b) impedire che i parassiti malarigeni si sviluppino negli anofeli che hanno punto individui infetti.

Per raggiungere il primo scopo occorre distruggere ogni giorno gli anofeli penetrati nelle abitazioni ed impedire l'ingresso ad altri dopo il tramonto; ciò si può ottenere soltanto nelle case ben protette con rete metallica. Invece il secondo scopo si può raggiungere indipendentemente dalla protezione meccanica catturando o distruggendo gli anofeli che si trovano nei ricoveri dell'uomo e degli animali.

Praticamente con la lotta contro gli anofeli adulti durante il periodo epidemico si raggiunge spesso l'uno e l'altro scopo, per cui questo metodo profilattico fu da noi usato largamente con successo sopratutto dopo l'introduzione degli insetticidi liquidi.

L'uso di mezzi liquidi nebulizzati nell'ambiente domestico per distruggere gli insetti fu preconizzato da GIEMSA (1911) che ricorse a nebulizzazioni di soluzione al 2,50 % di sapone potassico (sapone molle), ma il loro impiego si diffuse rapidamente soltanto dopo la scoperta del Flit, che costituì una vera conquista nel campo della profilassi della malaria.

La contemporanea scoperta dell'efficacia larvicida del Verde di Parigi (1923) ci ricondusse con entusiasmo alla lotta antilarvale, ma ben presto ci accorgemmo che questo metodo risolveva il problema della malaria urbana e dei piccoli centri rurali, ma *non risolveva il problema della profilassi della malaria nelle zone rurali dove poche case sono sparse su una vasta superficie.*

In questo caso lo spandimento del Verde di Parigi costituiva una operazione costosa e difficilmente controllabile da un buon servizio di Sanità pubblica. Perciò fin dal 1927 ritornammo alla lotta contro l'anofele adulto nelle aree bonificate delle Paludi Pontine e del Delta del Tevere per mezzo di insetticidi liquidi tipo Flit, con evidenti risultati profilattici ma senza nessuna prospettiva di raggiungere il risanamento dell'Italia.

Perciò nel 1930 riprendemmo lo studio della biologia degli anofeli per scoprire le vie seguite dalla natura per risanare molte regioni del Nord Italia e del Nord Europa, ove la malaria era scomparsa senza l'intervento dell'uomo. Era nostro intendimento di imitare la natura o di agevolare i processi naturali di risanamento.

Queste ricerche, condotte per cinque anni dall'estremità Sud dell'Italia alla Frisia orientale ci condussero a suddividere l'*Anopheles maculipennis* in 7 sottospecie, ciascuna dotata di caratteri biologici differenti.

Potemmo così dimostrare:

a) che l'*A. labranchiae labranchiae* e l'*A. sacharovi* hanno frequenti contatti alimentari con l'uomo e perciò sono buoni vettori dei parassiti malarici;

b) che l'*A. labranchiae atroparvus* può avere contatti alimentari con l'uomo quando concorrono favorevoli condizioni microclimatiche dell'ambiente;

c) che l'*A. messeae*, l'*A. maculipennis maculipennis*, l'*A. melanoon melanoon* e l'*A. melanoon subalpinus* hanno rari contatti alimentari con l'uomo, e perciò non sono in grado di mantenere la malaria allo stato endemico

Dimostrammo inoltre che la distribuzione delle sottospecie di *A. maculipennis* è legata alle condizioni del clima ed alla natura del suolo da cui dipendono i caratteri chimici e fisici delle acque. Così l'*A labranchiae labranchiae* è diffuso in tutto il Sud Italia al disotto di una linea che va da Cecina a Sud di Ancona; perciò la diffusione della malaria è più grave nel Sud Italia che nel Nord.

L'*A. labranchiae labranchiae* nel suo sviluppo larvale è sensibilissimo alle variazioni di temperatura dell'acqua, per cui si moltiplica prodigiosamente appena le condizioni climatiche siano favorevoli alla specie. Invece le larve delle sottospecie zoofile (*A. maculipennis maculipennis, A. messeae, A. melanoon melanoon* ed *A. melanoon subalpinus*) possono svilupparsi entro limiti di temperatura abbastanza vasti. Cioè, mentre le condizioni climatiche costituiscono un fattore decisivo per la riproduzione in massa dell'*A. labranchiae labranchiae,* per le sottospecie zoofile di *A. maculipennis* si osserva invece una cospicua indipendenza dai fattori climatici. Perciò l'area di diffusione dell'*A. maculipennis maculipennis* si estende dalla Sicilia alla Danimarca, mentre l'area di diffusione dell'*A. labranchiae labranchiae* è limitata da una linea netta che divide l'Italia centrale da quella settentrionale. Tutte le sottospecie di *A. maculipennis* si sviluppano bene in acqua dolce, ma l'*A. labranchiae atroparvus* ed in maggior grado l'*A. labranchiae labranchiae,* possono tollerare un tenue grado di salinità (2-9° per mille); a sua volta l'*A. sacharovi* può svilupparsi in acque salse fino al 16° per mille. Pertanto le sottospecie di *A. maculipennis* dannose all'uomo prevalgono in quelle aree in cui si trovano acque salmastre e scompaiono quando, con la bonifica e l'irrigazione, si lavano i terreni salmastri. Prevalgono allora le sottospecie innocue di *A. maculipennis* che nell'acqua dolce trovano condizioni più favorevoli di vita delle razze malarifere contendenti, e la malaria scompare.

Ma nel Sud Italia e nelle isole, cioè nel centro di dispersione dell'*A. labranchiae labranchiae*, questa sottospecie prevale sulle altre varietà

di *A. maculipennis* nelle acque salse e nelle acque dolci, per cui le bonifiche, che avevano condotto al risanamento di vaste aree dell'Italia centrale e settentrionale, non davano nessuna speranza di successo nell'Italia del Sud e nelle isole. Si avvicinava pertanto il crepuscolo della mia vita senza speranza di raggiungere la meta per cui avevamo tanto lavorato.

La scoperta dell'azione insetticida residua del DDT ci indusse a riprendere, con rinnovato ardore, la lotta contro l'anofele adulto che per trenta anni avevamo sempre raccomandata e rigorosamente applicata nelle zone rurali. Perciò fummo in grado di misurare prontamente i prossimi sviluppi di questa grande scoperta, quando altri non avevano che parole di mal celato scherno.

Nel luglio 1944 già stavamo studiando le proprietà del DDT che procurammo illecitamente, consapevoli che, quando lo scopo è nobile, e la via maestra per raggiungerlo è irragionevolmente preclusa, è concesso deviare dalla diritta via. Successivamente l'U.N.R.R.A. ci stese la sua mano fraterna, e potemmo iniziare la sperimentazione nel campo pratico che doveva condurci a formulare il piano quinquennale di risanamento dell'Italia.

Storia e sviluppo dell'uso del DDT.

Il *p, p'* diclorodifeniltricloroetano fu preparato da ZEIDLER nel 1874 aggiungendo cloralio al clorobenzene in presenza di acido solforico. Le sue proprietà insetticide vennero scoperte recentemente a Basilea nei laboratori scientifici della compagnia Geigy, dopo vent'anni di ricerche metodiche condotte sotto la direzione dei dottori P. LAÜGER, P. MÜLLER ed M. MARTIN e l'uso del prodotto fu brevettato nel 1939. Successivamente il diclorodifeniltricloroetano veniva denominato per brevità D.D.T. da un membro del Ministero britannico dei rifornimenti.

Alla fine del 1942 il Governo Inglese ebbe notizia di questa importante scoperta e ne diede comunicazione alle autorità americane. Quantunque gli scienziati inglesi abbiano contribuito a sviluppare le nostre cognizioni sul DDT, tuttavia si deve riconoscere che una gran parte del lavoro sperimentale fu compiuto in America. Quivi sotto la guida del dott. F. C. BISHOP ventinove ricercatori investigarono l'azione del DDT sugli insetti e nel maggio 1943 la Cincinnati Chemical Works, di cui la Compagnia svizzera Geigy è comproprietaria, ne iniziava la fabbricazione in un impianto pilota.

Pertanto la scoperta fondamentale delle proprietà insetticide per contatto del DDT, e la sua introduzione nella lotta contro gli insetti domestici e delle piante, si deve ai ricercatori svizzeri, mentre agli scienziati americani ed inglesi si deve lo studio dei metodi di applicazione.

Il DDT allo stato di purezza è rappresentato da una sostanza bianca,

cristallina che fonde a 108°, costituita da *p. p.'* diclorodifeniltricloroetano, la cui preparazione è molto costosa.

Con la parola DDT *tecnico* si indica invece il prodotto commerciale che contenga almeno il 75 % di DDT puro e che abbia un punto di fusione superiore a 88°.

Le ricerche condotte da numerosi ricercatori sulla composizione del DDT tecnico, hanno condotto a stabilire che questo prodotto contiene diversi sottoprodotti. Esaminando le proprietà insetticide dei sottoprodotti, che si ottengono nella fabbricazione del DDT tecnico, DOMENJOZ ha dimostrato che non si tratta di prodotti inerti, ma che possiedono una azione insetticida che per alcuni di essi è molto marcata.

Fra di essi si trova il clorofeniltricloroetano e il suo derivato clorato la cui azione insetticida si mostrò qualche volta superiore a quella del DDT puro; tuttavia a cagione della loro instabilità, questi due prodotti non sono adatti ad essere utilizzati nella pratica.

L'azione tossica per gli animali di questi sottoprodotti è minore di quella del DDT puro per cui, la loro presenza nel DDT tecnico, non aumenta la tossicità del prodotto.

L'azione insetticida per contatto del DDT può essere spiegata tenendo presente che questo prodotto è liposolubile, per cui può sciogliersi nella epicuticula degli insetti, diffondersi nei lipoidi e nei lipoproteidi contenuti nella cuticula chitinosa e penetrare nell'organismo degli insetti. Nella costituzione del tegumento degli insetti entrano sostanze di cui non si conosce ancora esattamente la natura, che per ciascuna specie mostrano particolari differenze, che potrebbero spiegare l'azione diversa che molti insetticidi per contatto esercitano sulle varie specie di insetti. Nel caso degli insetticidi per contatto ad azione neurotropa, nei quali rientra il DDT, la composizione chimica della fibra nervosa, ricca di lipoidi, permetterebbe la diffusione della sostanza tossica al sistema ganglionare periferico.

Questo sistema, che ha ricevuto finora poca attenzione da parte degli entomologi, si presenta come una trama sottocutanea di cellule multipolari che è connessa al sistema nervoso centrale (gangli sopra e sotto esofagei, catena ganglionare ventrale) ed invia direttamente fibre ai muscoli.

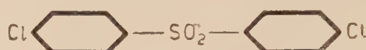
Esso eserciterebbe una funzione paragonabile a quella del sistema extrapiramidale dei mammiferi di cui è nota l'influenza sulla coordinazione dei movimenti.

All'eccitamento abnorme di questo sistema ganglionare periferico sottocutaneo sarebbe da riportare il caratteristico tremore delle zampe, facilmente osservabile nelle mosche e nelle zanzare intossicate con il DDT. Ad esso viene parimenti attribuita la mobilità spontanea delle zampe distaccate dal corpo negli insetti trattati con DDT.

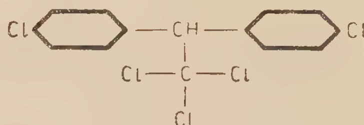
L'insetticida ecciterebbe le terminazioni nervose periferiche attraver-

so particolari organi di senso chemioricettori, organi che non hanno uguale distribuzione in tutti gli insetti, il che spiegherebbe la loro diversa sensibilità all'azione del DDT. Nelle mosche e nelle zanzare i tarsi ed i pretarsi, ricchi di tali sensilli chemioricettori, sarebbero particolarmente sensibili agli stimoli chimici. Ciò spiegherebbe come attraverso le terminazioni nervose, connesse con tali organi, questi insetti vengano facilmente intossicati con il semplice appoggiarsi ad una parete precedentemente irrorata con l'insetticida in questione.

E' noto dalle brillanti ricerche del gruppo svizzero che il clorobenzene, e specialmente il diclorobenzene, costituiscono ottimi veleni respiratori. Invece il p. p' diclorodifenil-sulfone, costituito da due nuclei clorobenzenici separati da gruppo negativo SO_2, costituisce un veleno per ingestione.



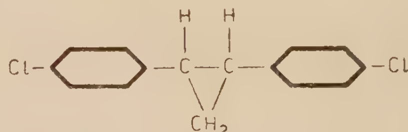
Ora il DDT contiene lo stesso sistema clorobenzenico che agisce come tossico, a cui è attaccato un gruppo cloroformico.



Pertanto, per procedere alla sintesi di nuovi insetticidi per contatto, si è tentato di introdurre il residuo di narcotici per inalazione nel gruppo tossico clorobenzenico; di fatti buoni insetticidi per contatto furono ottenuti condensando il monoclorobenzene con:

Bromoformio, $CHBr_3$
Cloruro di metilene, CH_2Cl_2
Nitrometano, CH_3NO_2
Etilene, C_2H_4
Etere etilico, $C_2H_5.O.C_2H_5$

Condensando il ciclo-propano H_2C—CH_2—CH_2 (anello) col clorobenzolo si ottiene un prodotto, dotato di una forte azione insetticida, che ha la seguente composizione:



Nuovi preparati sono stati ottenuti recentemente seguendo altre vie; alludo al Chlordane che è stato preparato dalla Velsicol Corporation di

Chicago ed ora è prodotto dalla Julius Hyman Company di Denver Colorado sotto il nome di Octa Klor ed al Chlorinated Camphene prodotto dalla Hercules Powder Company, conosciuto anche col nome di Toxaphene. Abbiamo inoltre sperimentato con successo il Gammexane, cioè l'isomero γ dell'esacloruro di benzene, conosciuto con vari nomi: esaclorocicloesane, BHC, e 666.

La scoperta di razze di mosche e di zanzare resistenti al DDT, avvenuta per opera del nostro Laboratorio, stimola attualmente gli studiosi di tutto il mondo alla ricerca di un nuovo prodotto che superi l'efficacia del DDT, e dalle nostre ricerche in corso già si può desumere che lo scopo è stato raggiunto. Il lettore può facilmente misurare l'importanza di questa nuova scoperta; ma si rassegnerà la natura a questa seconda sconfitta?

Le sostanze insetticide debbono in primo luogo possedere un'azione tossica selettiva per gl'insetti ed essere innocue per l'uomo, oppure possono essere tossiche per l'uomo e per gl'insetti, ma essere dotate di proprietà che permettono una differente diffusione della sostanza negli insetti e nell'uomo; così, la differente costituzione della epicuticola degli insetti e dell'epidermide dell'uomo, fa si che il DDT agisca selettivamente sugli insetti.

Per esplicare poi una lunga azione residua, occorre un sale stabile di fronte agli agenti chimici e fisici ed una tenue tendenza all'evaporazione perciò alcuni composti recentemente scoperti, di efficacia superiore al DDT, non sono entrati nell'uso pratico a cagione della loro instabilità e quindi della breve azione residua.

Il DDT nelle quantità usate a scopo insetticida è innocuo per l'uomo. I nostri tecnici nel numero di circa 200 che per quattro mesi, ogni anno. hanno irrorato il DDT, inalando notevoli quantità di DDT in polvere durante la preparazione della soluzione, o sotto forma di fine goccioline sospese nell'aria durante l'irrorazione, non hanno presentato alcun sintomo di avvelenamento.

Come ho premesso il DDT agisce sul sistema nervoso degli insetti determinando movimenti incoordinati degli arti e quindi la paralisi o la morte che avviene in tre-quattro ore per le mosche e le zanzare od in un tempo più lungo (12-14 ore) per i pidocchi e le cimici.

Il DDT non ha azione repellente, ma dopo il contatto con la parete trattata, gl'insetti, invasi da una dose letale di DDT, tentano di uscire. Generalmente gli anofeli dopo il primo contatto con la parete irrorata con DDT scendono in basso e si fissano sulla parete a pochi centimetri dal pavimento.

Il DDT è insolubile in acqua, è scarsamente solubile in petrolio ed è rapidamente solubile in molti solventi organici. Pertanto il DDT può essere usato sotto differenti forme fisiche e cioè: sotto forma di polvere, di sospensione in acqua, di soluzione in petrolio o di emulsione.

Noi stiamo studiando l'efficacia del DDT sospeso in acqua, preparato

dalla Casa Geigy, per vedere se non sia possibile abbandonare l'uso del DDT sciolto in petrolio o quello in emulsione, e realizzare così una notevole economia. I risultati constatati, dopo un mese dall'irrorazione del DDT in sospensione acquosa, non sono inferiori a quelli ottenuti con le soluzioni in petrolio; occorre vedere se l'azione residua ha la stessa durata di tempo.

Il DDT è per sua natura idrofobo e quindi non si mescola facilmente all'acqua per formare sospensioni. Perciò le polveri che si trovano in commercio, da usarsi in sospensione acquosa, sono costituite dal 50% di DDT e da una polvere inerte diluente, addizionata da sostanze che facilitano la dispersione delle particelle di DDT nell'acqua e la loro aderenza alla parete. Noi abbiamo usato il DDT in soluzione al 5% in peso di petrolio e l'emulsione ottenuta partendo da soluzioni in xilolo al 26 addizionate del 7% di triton X-100 al fine di rendere più stabile l'emulsione.

Su dieci milioni di metri quadrati irrorati nel 1946, la metà circa furono irrorati con l'emulsione e l'altra metà con soluzione in petrolio, ottenendo uguale risultato insetticida per intensità e durata. Usando le soluzioni in petrolio si ottiene sulla parete la formazione di regolari ammassi cristallini, come si può osservare nella fotografia che riproduco, ingrandita 4 volte, invece irrorando l'emulsione si ottengono ammassi cristallini più piccoli e diffusi in modo uniforme. Dall'esame delle due superfici irrorate, l'una con soluzione di DDT in petrolio e l'altra con DDT in emulsione, si sarebbe indotti a ritenere che i cristalli ottenuti irrorando soluzioni in petrolio siano più fragili e meno resistenti agli agenti fisici.



Fig. 2.

L'azione insetticida del DDT si manifesta sperimentalmente quando sia presente nella quantità di un miliardesimo di grammo per centimetro quadrato, ma naturalmente, per scopi pratici e per ottenere una lunga azione residua, occorre irrorare le pareti con quantità molto maggiori. In un ambiente del Laboratorio a pareti levigate, dipinte a calce, l'azione in-

setticida del DDT, irrorato nella quantità di grammi uno per metro quadrato si è prolungata per un anno, per cui in pratica abbiamo usato grammi 1,5-2 per metro quadrato di superficie trattata, per avere un margine di sicurezza. Dove, contrariamente al nostro avviso, fu irrorato una dose minore l'azione residua non si prolungò oltre sei mesi, mentre usando la quantità da noi raccomandata l'*azione insetticida residua si manifesta evidente anche dopo un anno dall'irrorazione.*

Quando si ricorra all'uso del DDT sciolto in petrolio il successo profilattico dipende in gran parte dalla cura posta nel preparare le soluzioni. Il DDT tecnico si presenta alle volte sotto forma di polvere cristallina, bianca, facilmente solubile, qualche volta sotto forma di grossi blocchi che occorre frantumare e polverizzare. Noi versiamo il DDT in polvere nella quantità di Kg. 7,5 entro fusti cilindrici contenenti Kg. 150 di petrolio, che durante il giorno, per tre giorni consecutivi, vengono esposti al sole e periodicamente rimossi per favorire la soluzione.

Il piano quinquennale per il risanamento dell'Italia.

Il primo esperimento nel campo pratico fu da noi iniziato, con il concorso dell'U.N.R.R.A., il 5 giugno 1945 nella zona sud-orientale della provincia di Latina, dove la lotta antilarvale offriva scarse possibilità di successo a cagione dell'estensione della superficie idrica. In questa zona si trova la pianura di Fondi, circondata da estese paludi, ove la popolazione, durante il periodo primavera-estate, vive in capanne costruite con canna palustre. Volli estendere la lotta contro l'insetto adulto in questa zona, che riproduce le conduzioni di molte zone rurali dell'Italia del sud, per dimostrare che malgrado che la popolazione dorma fuori delle capanne durante le calde notti estive, tuttavia il DDT esplica ugualmente la sua efficace azione profilattica.

Avevo osservato, molti anni fa nelle Paludi Pontine, una capanna vuota esistente presso uno steccato che delimitava lo spazio occupato da un allevamento di maiali; la capanna, distante circa 20 metri dallo steccato, era piena di anofeli che avevano succhiato sangue dai maiali. Evidentemente gli anofeli nelle ore propizie pungevano i maiali all'aperto e cercavano successivamente ricovero nella capanna vuota.

Lo stesso doveva avvenire per la popolazione della campagna di Fondi, che durante la notte dorme all'aperto nei pressi della capanna; gli anofeli dopo aver punto l'uomo durante il sonno dovevano cercare ricovero nella vicina capanna. Difatti, irrorando il DDT nelle case e nelle capanne esistenti nelle campagne della zona sud-orientale della provincia di Latina, osservammo una rapida diminuzione del numero degli anofeli ed un arresto nella trasmissione della malaria, desunta dal numero dei malarici denunciati.

Noi avevamo irrorato con DDT le pareti interne di tutti i ricoveri dell'uomo e degli animali esistenti nella pianura di Fondi, compresa la zona attorno al paese in cui si praticava la lotta antilarvale. Ora si ottenne uguale risultato profilattico nella zona sottoposta al trattamento con solo DDT e nella zona circostante Fondi, in cui si praticò la lotta antilarvale e la lotta contro l'anofele adulto. Da ciò si poteva dedurre che la lotta antilarvale era superflua quando si ricorra all'uso razionale del DDT.

Analoghi risultati erano intanto conseguiti dal dr. Soper e collaboratori nel delta del Tevere ove la popolazione rurale vive in buone condizioni di abitabilità.

Traemmo pertanto la conclusione che nell'area del Mediterraneo, ove la malaria è in gran parte diffusa dagli anofeli appartenenti al gruppo dell'*A. maculipennis, la lotta contro l'insetto adulto è sufficiente a sopprimere la trasmissione della malaria, qualunque siano le condizioni di abitabilità.*

Considerando poi che la lotta contro l'insetto adulto costa meno che la lotta antilarvale, proposi un piano di eradicazione della malaria dal suolo d'Italia entro il periodo di cinque anni. Questo programma, che io resi noto il 20 gennaio 1946 in una conferenza tenuta nell'Istituto Superiore di Sanità, fu accolto con benevolo stupore. Sembrava a molti impossibile che questa malattia, che per duemila anni aveva tristamente influito sui destini dell'Italia, potesse essere sradicata in cinque anni; occorre però considerare che il programma quinquennale costituisce l'epilogo di una lotta che dura, con alterne vicende, da mezzo secolo; così il risanamento dell'Agro Romano coronerà l'opera di Gioacchino Escalar che in trent'anni di lavoro fiducioso e tenace preparò gli spiriti e la vittoria che sta per concludersi.

Seguendo questo nuovo indirizzo proponevo di abbandonare tutte le misure profilattiche fin qui applicate: dalla lotta antilarvale alla protezione meccanica, dalla profilassi chininica alla grande bonifica, che avrebbe dovuto indirizzarsi soltanto verso scopi agricoli, rispettando il patrimonio idrico, sotto qualsiasi forma, tanto utile nelle aree subtropicali del Mediterraneo.

Nel programma presentato l'Italia è stata divisa in quattro zone; tale divisione non è arbitraria, ma risponde alle caratteristiche della popolazione anofelica presente in ciascuna zona.

Nella *I zona* prevale l'*A. labranchiae atroparvus* che può, in determinate circostanze, mantenere un tenue grado di endemia malarica. In questa zona l'uso del DDT, limitato alle poche zone in cui permane ancora la trasmissione della malaria, condurrà ad eliminare questa malattia.

La II zona comprende un'area profonda circa venti km. lungo il litorale veneto-emiliano ove si sviluppa in notevole quantità l'*A. sacharovi*. L'endemia malarica si estende in profondità superiore ai 20 km. ove pre-

vale l'*A. messeae* a cagione dell'importazione di portatori di gametociti dall'area occupata dall'*A. sacharovi*. L'*A. messeae* non è in grado di mantenere la malaria allo stato endemico, ma può contribuire a trasmettere l'infezione per l'importazione periodica di portatori di gametociti nell'area oc-



Fig. 3.

cupata. Pertanto al fine di eradicare la malaria dalla II zona sarà sufficiente estendere l'irrorazione di DDT alle zone occupate dall'*A. sacharovi*.

La III zona occupa la parte periferica dell'area di dispersione dell'*A. labranchiae labranchiae*, che infesta le pianure del Lazio e della Toscana. Perciò in quest'area l'irrorazione col DDT verrà limitata alle abitazioni situate in pianura eccettuato verso il limite della IV zona, ove esiste malaria endemica fino a 300 m. sul livello del mare.

La IV zona comprende l'Italia del sud e le isole che costituiscono il centro di dispersione dell'*A. labranchiae labranchiae*, che trovasi diffuso in pianura ed in montagna fino a 1000 m. sul livello del mare. In questa zona

è difficile tracciare limiti dell'area da trattare con DDT e solo accurate ispezioni potrano indurci a precisare i limiti della nostra azione profilattica.

Nel primo anno ho proposto di trattare con DDT tutti i ricoveri dell'uomo e degli animali presenti nelle regioni malariche comprese nella I, II, III zona; nel secondo anno si dovrebbe trattare la metà della IV zona corrispondente al litorale tirrenico e la Sicilia; nel terzo anno la seconda metà della quarta zona comprendente il litorale ionico ed adriatico.

Il piano quinquennale per il risanamento dell'Italia, comunicato il 20 gennaio 1946, aveva avuto la preventiva adesione del Direttore Generale della Sanità Pubblica Dott. SOLIMENA che durante lo stesso anno attese a predisporre i mezzi necessari per assicurare l'esecuzione dei lavori previsti. Ma per condurre a termine un'impresa di così vaste proporzioni non bastava avere i mezzi necessari, ma occorreva negli esecutori passione e convincimento; ora la passione era esaltata dalla visione delle sciagure della Patria ed il convincimento derivava da esperimenti condotti con scrupolosa cura.

Però il convincimento dello studioso rassomiglia un po' alla fede dell'eretico che cerca continuamente nuove prove per credere; e perciò nel 1946 mentre si predisponevano i mezzi per l'attuazione del piano quinquennale, noi iniziammo il risanamento della terza zona per trarre nuovi criteri pratici per la futura organizzazione.

La lotta contro l'anofele adulto nel 1946.

Collaborò a questa impresa l'U.N.R.R.A. che fornì il DDT, il petrolio, numerosi automezzi e l'opera dell'ing. PAVENELLO; l'ENDSI che fornì due autocarri; la Direzione Generale della Sanità Pubblica che fornì i mezzi per assumere 18 tecnici e 125 disinfestori; il Comitato Antimalarico di Latina con a capo il dott. ALESSANDRINI e l'Istituto Superiore di Sanità con l'opera mia, del dott. MOSNA e di tutti i miei assistenti e tecnici.

L'irrorazione del DDT ebbe inizio il 5 marzo 1946 ed ebbe termine verso la metà di maggio. Siccome l'incubazione della terzana maligna è inferiore a 15 giorni e le prime infezioni si manifestano nei primi giorni di giugno, abbiamo desunto che la trasmissione della malaria ha inizio nella seconda quindicina di maggio; perciò predisponemmo che l'irrorazione del DDT fosse terminata prima del 15 maggio.

Negli anni successivi, siccome l'azione insetticida residua del DDT dura oltre un anno, si potrà estendere l'irrorazione fino ai primi di giugno. Nell'area trattata si riscontrano case nuove e pulite dell'Agro Pontino, antiche case con muri mal conservati della zona sud-orientale di Latina, e villaggi di capanne costruite con canna palustre, con paglia o con legno, per cui i risultati conseguiti si riferiscono a paesi che presentano tutte le possibili condizioni di abitabiltà.

Risultati conseguiti.

I risultati conseguiti nella lotta contro gli insetti domestici furono buoni in tutte le zone trattate in qualsiasi condizione di abitabilità.

Scomparvero così dalle abitazioni trattate con DDT le zanzare, le mosche, i flebotomi, le pulci e, in gran parte, le cimici, raggiungendo in tal

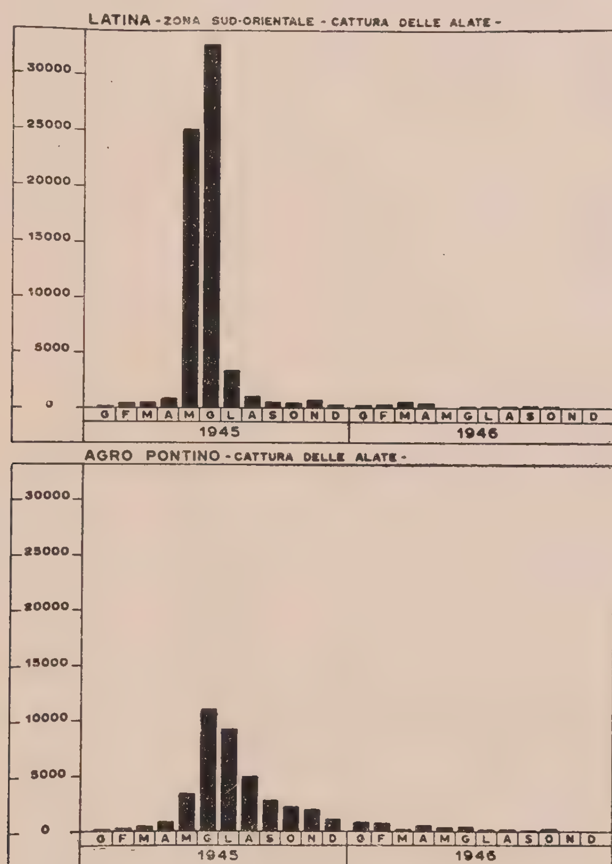


Fig. 4.

modo tutti gli scopi dell'igiene, che non tende soltanto a proteggere l'uomo dalle malattie infettive, ma a rendere la vita più complessa e più felice.

La popolazione rurale si trovò d'un tratto come in un nuovo mondo privo di insetti micidiali e tormentosi, che trasportavano il male ed impedivano il riposo dopo la dura fatica del giorno.

Il controllo quotidiano degli anofeli nelle stazioni di cattura e nelle case circostanti venne eseguito dai nostri tecnici, da noi controllati perio-

dicamente. Il risultato delle catture è riportato nel grafico Fig. 4 che dimostra il successo del lavoro compiuto. Quest'anno (giugno agosto 1947) assistiamo praticamente alla scomparsa dell'*A. labranchiae labranchiae;* i rari esemplari catturati su qualche tela di ragno di recente formazione non ci consentono di continuare la grafica.

Oltre alla cattura degli anofeli adulti il nostro personale ispezionava i focolai larvali; scomparvero le larve dai focolai di *A. sacharovi* e nell'area dell'*A. labranchiae labranchiae* le larve furono ridotte di numero o scomparvero. Invece nelle aree occupate prevalentemente da *A. maculipennis maculipennis* e dall'*A. claviger,* si riscontrò un cospicuo numero di larve in tutti gli stadi; nostre osservazioni compiute al tramonto e nelle ore notturne ci hanno rivelato che l'*A. maculipennis maculipennis* entra nei ricoveri animali ove punge il bestiame e quindi una parte si fissa sulle pareti ed una gran parte fuoriesce all'aperto, ove vive allo stato silvestre come l'*A. claviger.* Perciò nei focolai larvali troviamo un gran numero di larve di *A. claviger* e di *A. maculipennin maculipennis.*

La mosca domestica è praticamente scomparsa nel 1946, ma quest'anno è riapparsa in gran numero malgrado sia stata praticata una seconda irrorazione di DDT nella primavera 1947.

Estese ricerche, compiute nel campo pratico ed in laboratorio, ci hanno indotto a ritenere che si tratti di una varietà di mosca domestica, che ha la proprietà di resistere all'azione insetticida del DDT; questa proprietà si trasmette alle generazioni successive ottenute nei nostri allevamenti.

Noi abbiamo differenziata questa varietà col nome di *Musca domestica* var. *tiberina* SACCÀ, il nostro assistente che richiamò per primo la attenzione sulla presenza di mosche resistenti all'azione insetticida del DDT.

La natura non fa mai due cose perfettamente uguali, per cui in una specie abbiamo tante variazioni individuali che talvolta è difficile separare una varietà nell'ambito della stessa specie, sopratutto quando i caratteri varianti sono assai tenui.

Il DDT ci ha rivelato che esistono per lo meno due varietà di mosca domestica caratterizzate, per ora, dalla diversa costituzione dell'epicuticola che in una varietà permette la penetrazione del DDT, mentre nell'altra varietà protegge l'insetto dall'azione tossica di questo veleno.

Sono in corso ricerche sui caratteri morfologici e biologici di questa varietà di mosca domestica che ha destato in noi serie apprensioni, finchè abbiamo trovato un prodotto che ha energiche proprietà insetticide anche su questa varietà.

Abbiamo ugualmente osservato in alcune zone una varietà di *Culex pipiens autogenicus* resistente all'azione del DDT, perciò la presenza di mosche e di *Culex* non deve indurre a ritenere che il DDT sia stato male irrorato. Comunque, nel prossimo anno, saremo in grado di combattere anche questa varietà di *Culex* tanto molesta.

I risultati profilattici conseguiti sono riassunti in una serie di grafici che illustro brevemente. Il lettore potrà trovare i dati illustrati dai grafici nella relazione che verrà pubblicata nel N. 1 dei Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità del 1948.

Si possono dedurre i risultati conseguiti: dall'indice splenico e paras-

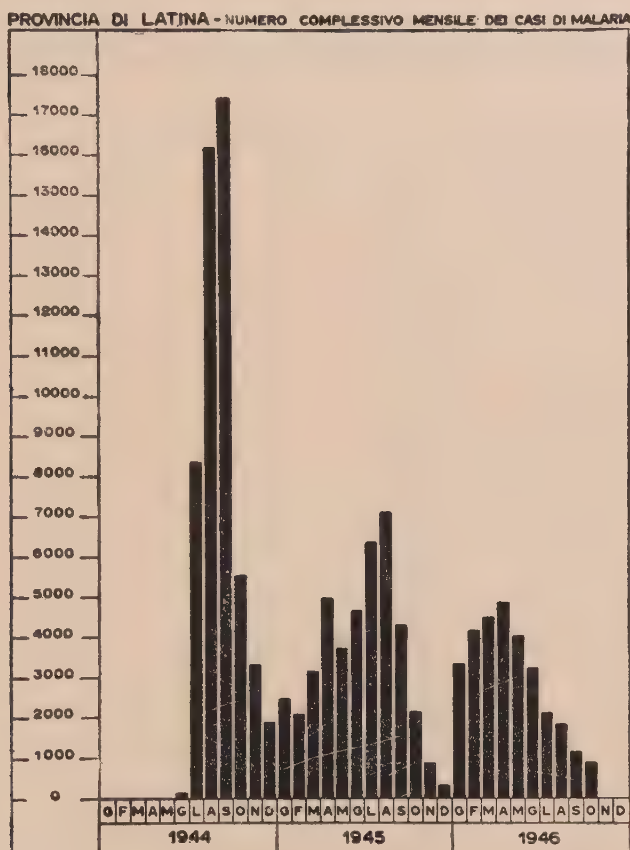


Fig. 5.

sitario; dalla riduzione della mortalità; dal numero dei casi di febbre malarica denunziati e dalla quantità di chinina ed atebrin consumati.

La ricerca microscopica venne eseguita su strisci di sangue prelevati dai casi che si presentavano agli ambulatori diretti da medici esperti. Tale ricerca ha perduto lo scopo pratico che si prefiggeva quando la lotta era diretta contro il parassita, ma, quando è possibile eseguirla senza dispersione di mezzi, può contribuire a misurare il successo conseguito.

Abbiamo utilizzato a questo scopo l'opera dei laboratori provinciali

d'igiene, senza ricorrere ai centri diagnostici che Gosio ed io creammo con ragionevole entusiasmo in tempi ormai lontani, affascinati dalla autorità di Koch di cui Gosio era uno dei più insigni allievi.

Quando l'endemia malarica si estingue, in un'area ben controllata, il risultato dell'esame microscopico è positivo appena nel 5-10% dei casi denunciati; perciò nelle nostre statistiche accettiamo come casi di malaria

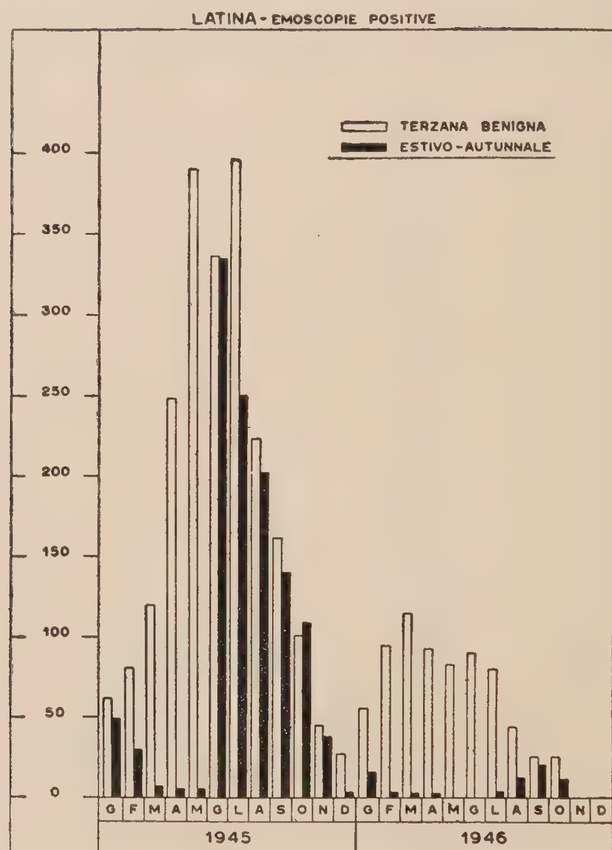


Fig. 6.

tutti quelli accertati clinicamente, senza preoccuparci del risultato dell'esame microscopico, che condurrebbe ad una artificiosa riduzione dell'incidenza della malaria.

La grafica Fig. 5 che esprime il numero dei casi denunziati, mostra con evidenza che è stata soppressa la trasmissione della malaria, difatti il numero dei casi di febbri malariche denunziati inizia a scendere in maggio e continua a declinare nei mesi estivi, fino a ridursi ad un numero trascurabile di febbri recidive nel 1947 (che non figura nel nostro grafico).

La grafica Fig. 6 rappresenta il numero dei casi di terzana benigna e di terzana maligna accertati microscopicamente negli anni 1945-46. Dall'analisi di questa grafica si desume: *a*) che la comparsa della terzana maligna segna l'inizio sicuro della trasmissione della malaria; *b*) che la terzana maligna è una malattia acuta, che guarisce entro un anno e scompare quando cessa la trasmissione, mentre la terzana benigna dà un numero cospicuo di recidive nell'anno successivo a quello in cui avvenne l'infezione, ed un minor numero nel secondo anno, per estinguersi praticamente nel terzo anno.

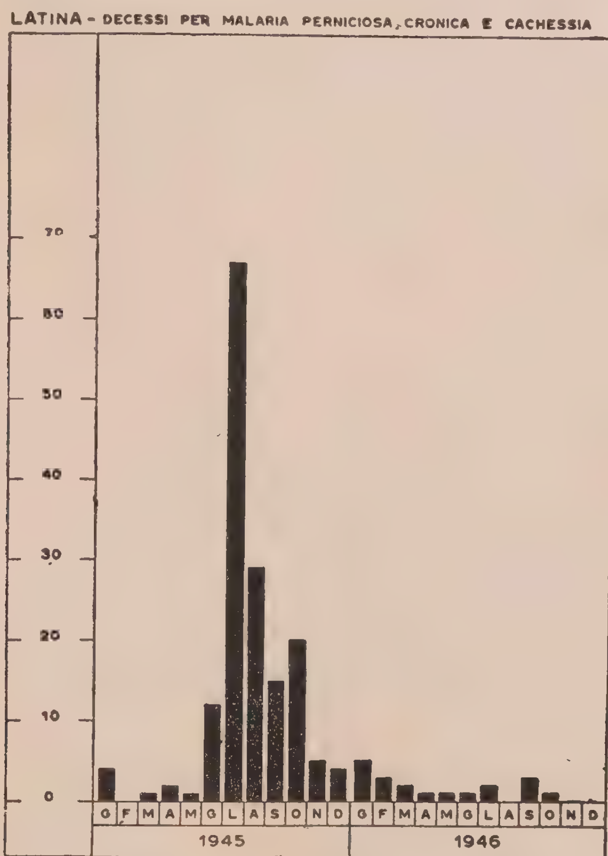


Fig. 7.

I casi di terzana maligna che si sono verificati tardivamente in settembre vennero riscontrati nelle zone periferiche non trattate con DDT dove la malaria esiste allo stato di lieve endemia.

La grafica Fig. 7 illustra la mortalità per malaria acuta, per malaria cronica e per cachessia malarica; nel 1946 furono denunziati alcuni morti

per malaria cronica specialmente durante il periodo interepidemico; non pervenne nessuna denunzia di morte per malaria perniciosa.

Di regola noi procediamo alla misurazione della milza ed all'esame del sangue nel marzo dell'anno successivo, perciò i dati dell'indice splenico e parassitario compiuto nel marzo 1946 ci dà la misura dell'endemia per l'anno 1945. Dall'annessa tabella si può desumere che l'indice parassitario

DATI DELL'INDICE SPLENICO — Anno 1946 e 1947.

ANNI	Numero milze esaminate	Percentuale delle milze per ogni gruppo						Indice splenico
		0	P	1	2	3	4	
Marzo 1946	2395	65,8 %	19,3 %	9,9 %	4,6 %	0,3 %	0,1 %	34,2 %
Marzo 1947	3227	75,2 %	17,3 %	5, %	2,1 %	—	0,3 %	24,8 %

DATI DELL'INDICE PARASSITARIO — Anno 1946 e 1947.

ANNI	Numero esaminati	positivi		percentuale		Indice parassitario
		T. B.	T. M.	T. B.	T. M.	
Marzo 1946	2395	225	22	9,40 %	0,92 %	10,32 %
Marzo 1947	3227	13	3	0,40 %	0,09 %	0,49 %

nel 1946 è ridotto ad un ventesimo di quello riscontrato per il 1945; il tumore splenico si riduce più lentamente, e perciò la differenza fra l'indice splenico del 1945 e del 1946 è meno marcata. I dati più interessanti sono quelli che si riferiscono alla mortalità per tutte le cause ed alla natalità. Noi abbiamo preso in considerazione la mortalità e la natalità di tre comuni limitrofi, che non registrarono mai la malaria allo stato endemico: Cori, Frignano ed Aversa. Questi tre comuni mostrarono nel 1945 una curva pressochè uniforme della mortalità, che presentava le stesse caratteristiche dei

paesi malarici; si aveva cioè un aumento costante della mortalità in corrispondenza dei mesi invernali e nei mesi estivi. (Graf. n. 8). Pertanto si doveva dedurre che, nei mesi estivi nelle zone malariche la mortalità aumenta non solo a causa della malaria, ma per cause comuni ai luoghi malarici e non malarici. Nell'anno seguente (1946), dopo il trattamento del DDT, osservammo che nelle zone trattate la curva della mortalità non presentò l'elevazione estiva; anzi si osservò durante l'estate una marcata diminu-

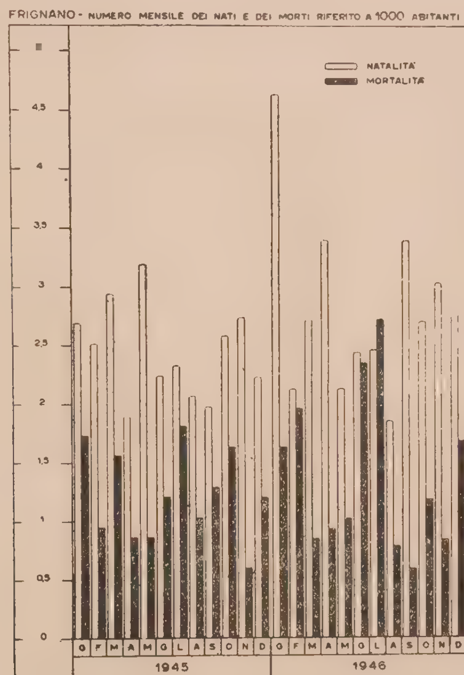


Fig. 8.

zione della mortalità, per cui la media annua scese intorno al 10-11 per mille come si osserva nei paesi più salubri del nord Europa.

Invece nei paesi non malarici, non trattati con DDT, la curva annua della mortalità mantenne anche nel 1946 il consueto caratteristico aumento estivo. Nel 1946 era dunque scomparsa nei paesi malarici la causa, comune ai paesi malarici e non malarici, che determina l'aumento della mortalità durante il periodo estivo.

Siccome nei paesi malarici trattati con DDT erano scomparse le mosche, che erano rimaste in numero enorme nelle zone salubri non trattate con DDT, abbiamo desunto che l'aumento estivo della mortalità è dovuto alla trasmissione di germi patogeni per opera degli insetti domestici e sopratutto delle mosche.

L'importanza delle mosche nella trasmissione delle malattie infettive trova pertanto nelle nostre ricerche una nuova conferma. Tra le mosche domestiche la più importante sotto questo punto di vista è la *Musca domestica*, specie cosmopolita formante il 90-95 % delle mosche che si rinvengono nelle abitazioni. Essa opera il trasporto di germi patogeni per via meccanica in due modi: imbrattando semplicemente con i materiali infetti il suo corpo e

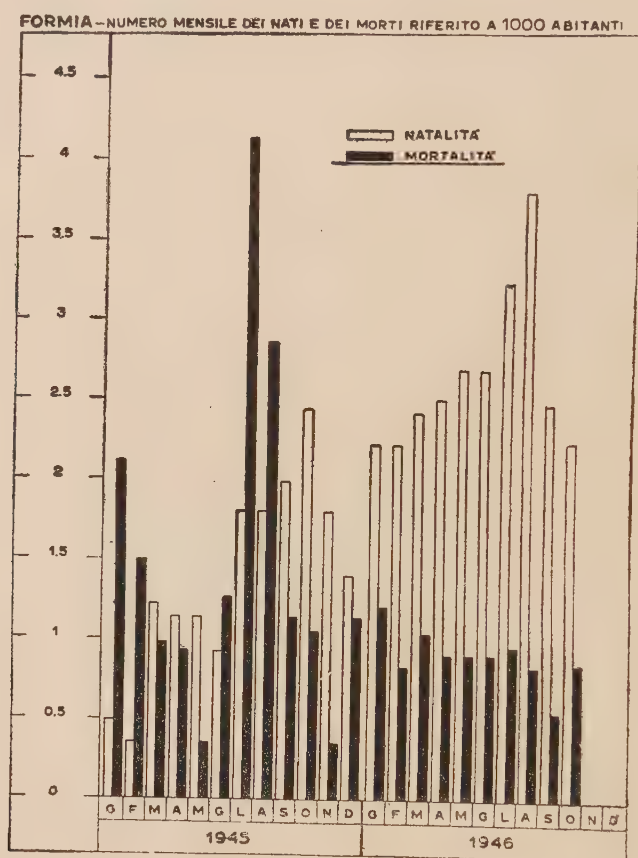


Fig. 9.

quindi posandosi sui cibi consumati dall'uomo, oppure nutrendosi con materiali inquinati da agenti patogeni e depositando i germi, ancora vitali, sugli alimenti umani insieme con le feci e con il rigurgito dell'ingluvie.

Già dal 1883 G. B. Grassi esprimeva l'opinione che parecchi microrganismi patogeni potessero sopravvivere per qualche tempo nell'intestino delle mosche ed essere da queste diffusi. Sul pericolo per la salute umana rappresentato dalle mosche richiamavano più tardi l'attenzione l'entomologo americano Howard (1911) ed il Berlese. Numerose ricerche di altri

osservatori si sono susseguite a dimostrare l'importanza delle mosche nella diffusione di malattie come il tifo addominale, la dissenteria amebica e bacillare, ed il colera.

Così fin dal 1888 CELLI aveva dimostrato che, nutrendo mosche su culture di *B. typhosus*, questo si manteneva vitale nel contenuto intestinale e negli escrementi dell'insetto.

Nel 1920 MANSON BAHR trovò che il bacillo di SHIGA può sopravvivere nell'intestino delle mosche per almeno quattro giorni e che l'insetto può disseminarlo con le feci o con il rigurgito dell'ingluvie.

Che le mosche abbiano una importanza nella diffusione della dissenteria amebica è dimostrato dalle osservazioni di WENYON e di O' CONNOR nel 1917, e da quelle di P. N. ROOT (1921). Quest'ultimo ha trovato che le cisti di *Entamoeba histolytica* sopravvivono per circa 49 ore nello intestino delle mosche. Se però una mosca contenente cisti rimane annegata in acqua, latte od altro alimento liquido, le cisti di *E. histolytica* possono sopravvivere per circa una settimana.

Le nostre ricerche dànno la misura dei danni cagionati dalle mosche all'umanità; esse rivelano che la mortalità cagionata all'uomo dalle mosche è di gran lunga superiore a quella cagionata dalle zanzare, ma siccome le mosche uccidono in modo subdolo e le zanzare in modo drammatico, così l'umanità si è difesa dalle zanzare e non dalle mosche.

Ora la lotta contro gl'insetti domestici costituisce uno dei compiti fondamentali dei poteri pubblici, è l'unica via per mantenere ancora l'equilibrio fra nati e morti nei paesi a bassa natalità.

Eradicazione degli anofeli e controllo degli insetti domestici.

L'avventura intellettuale non ha limiti e perciò i nostri giudizi non sono mai definitivi; man mano che si allargano i confini del sapere si modificano e si correggono i nostri giudizi. Non sorprenderà quindi se, alla distanza di tre anni, dopo aver esplorato una vasta superficie sperimentale per stabilire il rendimento profilattico del controllo degli insetti domestici, rimetto in discussione l'opportunità, non la possibilità, di eradicare gli anofeli dalle zone malariche d'Italia.

Il risultato dell'esperimento di eradicazione dell'*A. maculipennis*, che si sta svolgendo in Sardegna, ha una importanza che supera i limiti della lotta antimalarica e perciò deve essere condotto a termine; è necessario conoscere, in quanto tempo e con quanto danaro, si può sopprimere una specie di insetti da una zona compresa nella sua area di dispersione.

Fino a tre anni fa il nostro scopo era di liberare l'Italia dalla malaria; oggi invece la nostra aspirazione tende a raggiungere uno scopo più vasto e proficuo cioè la distruzione di tutti gl'insetti domestici, vettori di gravi malattie e causa di afflizione per le popolazioni rurali.

Noi siamo ancora molto ignoranti della biologia degli insetti e dei loro rapporti con l'ambiente e perciò non siamo sempre in grado di prevedere gli esiti della lotta contro tutte le specie dannose; le conoscenze sulla biologia degli anofeli, acquisite negli ultimi venti anni per opera nostra, ci permettono di guardare con serenità lo sviluppo del piano quinquennale, ma la natura ci hà serbato amare sorprese nella lotta contro le mosche, i culex e le pulci.

Indubbiamente la lotta da noi ingaggiata contro gl'insetti domestici avrà alterne vicende, ma l'uomo ne uscirà vittorioso, difatti, alla distanza di pochi mesi dalla scoperta di varietà di insetti resistenti al DDT, già *sperimentiamo con successo nuovi insetticidi efficaci contro queste varietà.*

Si può quindi ritenere con sicurezza che i giorni nefasti degl'insetti domestici sono contati.

L'eradicazione dell' *A. maculipennis* dall'Italia è un'operazione costosa che richiede non meno di quindici anni; ridurre li numero degli anofeli ad un limite trascurabile costituisce un'operazione poco costosa; ciò che costa è la soppressione dell'ultimo anofele superstite.

Se poi consideriamo i problemi profilattici di altri paesi del mondo, tutti saranno persuasi che non possiamo attualmente indirizzarci verso l'eradicazione di una specie sola d'insetti; sopravvivrebbero gl'insetti trasmettitori di malattie devastatrici per l'uomo, quali la malattia del sonno, la febbre gialla, la peste, il tifo esantematico e la Dengue ed il gruppo di malattie trasmesse dalle mosche. Milioni di uomini sarebbero ancora ogni anno uccisi o debilitati da queste malattie e regioni ricchissime ed estese sarebbero ancora precluse all'attività dell'uomo a causa della presenza di insetti trasmettitori di germi patogeni.

Pertanto la lotta contro gl'insetti trasmettitori di malattie all'uomo non può aver per mira l'eradicazione di una sola specie nociva, ma il controllo di tutti gl'insetti domestici nocivi alla sua salute. *Questo scopo noi possiamo ottenerlo con mezzi economici non superiori alle possibilità finanziarie delle provincie malariche d'Italia, ricorrendo all'irrorazione con il DDT, addizionato di nuovi insetticidi, una volta all'anno, senza l'integrazione di nessun'altra misura profilattica.*

Abbiamo visto con sorpresa che gli Alleati nel 1946 hanno applicato in Grecia la lotta contro l'insetto adulto e la lotta antilarvale con grave dispendio; evidentemente non avevano fiducia nè nella lotta contro l'insetto adulto nè nella lotta antilarvale.

Noi continuiamo risoluti il cammino per la via intrapresa mentre i chimici di tutto il mondo collaborano per rendere sempre più efficace la lotta contro gl'insetti domestici. I prossimi cinque anni saranno decisivi nella lotta intrapresa in Italia contro gl'insetti domestici e nei prossimi venticinque anni si matureranno i destini del continente africano.

Ventitrè anni fa Gosio ed io, discutendo sulla regressione della malaria in Italia, concludemmo: « Verrà certo il tempo fortunato in cui la redenzione sarà completa; la scienza perfezionando le conoscenze sulla natura del morbo insegna e permette di accelerarla ». (5)

La nostra previsione sta per realizzarsi; la vittoria sta per concludersi in un campo più vasto e più proficuo per l'umanità.

Scrivendo queste note, più volte il pensiero fu rivolto alla Fondazione Rockefeller, che contribuì con aiuti cospicui al risveglio degli studi malariologici in Roma ed a fondare la Stazione Sperimentale, da me diretta ove furono compiute classiche ricerche che svelarono i misteri che circondavano l'epidemiologia della malaria e ove fu preparato il personale che ora attende al risanamento dell'Italia.

---

(5) Gosio B. e Missiroli A. (1925). « Centri diagnostici nella lotta antimalarica ». Arti grafiche Petrilli, Spoleto.

RIASSUNTO

L'A. descrive i risultati conseguiti col DDT negli anni 1945-1946. Mette in rilievo l'esistenza di varietà di *Musca domestica* e di *Culex pipiens* resistenti al DDT e la possibilità di controllare queste varietà con nuovi prodotti di recente preparazione.

Discute i vantaggi dell'eradicazione degli anofeli malarigeni e del controllo degli insetti domestici. Conclude raccomandando il controllo degl'insetti domestici che conduce ad un più radicale risanamento dell'ambiente.

SUMMARY

The author describes the results obtained with DDT during the years 1945-1946. He emphasizes the existence of varieties of *Musca domestica* and *Culex pipiens* resistent to DDT and the possibility of controlling these varieties with newly prepared products. The author discusses both the advantages of the eradication of the malaria transmitting anopheles and of the domestic insects' control. He concludes recomending the control of domestic insects because it leads to a more radical recovery of the surroundings.

RÉSUME'

L'A. rélate les résultats obtenus avec le DDT durant les années 1945-1946. Il souligne l'existence de variétés de *Musca domestica* et de *Culex pipiens* résistentes au DDT, et la possibilité de controller ces variétés avec de nouveaux produits récemment préparés.

Il discute les avantages de l'éradication des anophèles du paludisme et de la lutte contre les insectes domestiques. Il conclut en préconisant la lutte contre les insectes domestiques comme la seule conduisant à un rétablissement radical du mileu.

RECENSIONI

A. Corradetti, « Introduzione allo studio dei protozoi parassiti dell'uomo ». Istituto Superiore di Sanità — Fondazione E. Paternò, Roma, 1947. Pag. 100; L. 300.

L'esperienza del Corradetti sui problemi dei plasmodi malarigeni e dei protozoi in generale, acquistata in anni di lavoro scientifico in Italia e all'Estero, ci ha fornito un lavoro introduttivo allo studio dei protozoi parassiti dell'uomo, uno dei cui pregi maggiori consiste nella chiarezza e semplicità con cui è trattato un argomento così vasto e complesso. Dato lo scopo del volumetto, l'A. si è valso della sua competenza per sfrondare la materria di tutta la grande congerie di ipotesi e di fatti non ancora sufficientemente accertati o confermati di cui è ripieno lo studio della protozoologia e che costituiscono uno degli ostacoli più complessi per chi voglia addentrarsi nello studio di codesta materia. L'A. si è pertanto limitato alla esposizione dei soli fatti o nozioni scientificamente accertati, che possano servire di base sicura a chi voglia approfondire le sue conoscenze sull'argomento. E' quindi nel metodo critico usato per la selezione delle nozioni più che nel numero delle nozioni stesse (dalle quali per brevità si è eliminato anche ogni citazione di Autore) che va ricercato il valore e la ragion d'essere di questo breve e denso lavoro.

Il volume contiene, divisi per capitoli, tutti i fatti essenziali relativi alla biologia, alla morfologia, ai cicli, alla trasmissione, alla specificità, ai principi immunitari e relative reazioni, ai metodi di studio diagnostici, culturali, sperimentali dei protozoi parassiti dell'uomo, nonchè un breve saggio sulla evoluzione e morfologia dei tripanosomi e dei plasmodi nell'ospite invertebrato.

31 figure schematiche e semischematiche illustrano efficacemente le 25 specie di protozoi descritte. Utilissime le tavole sinottiche riguardanti i metodi di elezione per la fissazione e colorazione dei diversi generi di protozoi, sia a scopo diagnostico che a scopo di studio morfologico; per quanto riguarda i metodi di cultura dei protozoi, una bibliografia accurata rimanda ai lavori originali degli AA.

Il libro riempie una sensibile lacuna nella letteratura medica italiana, e incontrerà il favore di tutti coloro che sanno apprezzare la serietà e la profondità delle cognizioni più dello sterile giuoco esibizionistico delle ipotesi e delle teorie.

Il volumetto è il primo di una serie di monografie pubblicate dalla Fondazione Emanuele Paternò, che oggi gestisce i Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità.

A. Missiroli

Edm. Sergent, A. Donatien, L. Parrot et F. Lestoquard, « Etudes sur les Piroplasmoses bovines ». Institut Pasteur d'Algerie, Alger, 1945. pp. 816.

La vasta monografia che l'Institut Pasteur d'Algerie offre al pubblico degli studiosi, rappresenta il coronamento di una lunga attività di studi, di esperienze e di lavoro che per trenta anni hanno costituito l'obbiettivo della Scuola di Edmod Sergent e collaboratori.

Non inferiore all'interesse della trattazione scientifica, che si sviluppa sul piano delle conoscenze moderne ed originali degli Autori, è l'interesse pratico del lavoro in quanto i metodi di vaccinazione personalmente elaborati e perfezionati dagli Autori costituiscono un passo decisivo nella lotta e nella prevenzione di una malattia che rappresenta una così grave minaccia per l'agricoltura dell'Africa del Nord.

L'opera è costituita di quattro parti fondamentali.

Nella prima parte, alla definizione della natura delle Piroplasmosi, segue una precisa esposizione sulla sistematica e sulla morfologia dei protozoi responsabili della malattia e sugli artropodi che la trasmettono.

Interessanti, a questo riguardo, sono le dettagliate notizie che interessano la fisiologia e la biologia delle zecche e l'esposizione, in quadri sinottici, dei differenti caratteri morfologici necessari per la determinazione dei vari generi.

Nella seconda parte lo studioso troverà descritti i metodi utilizzati dai ricerca-

tori per lo studio e l'osservazione degli animali infetti e delle zecche, per la riproduzione sperimentale della malattia.

Segue poi una esposizione, in capitoli separati, delle cinque Piroplasmosi bovine che infestano l'Africa del Nord.

In ognuno di questi capitoli la trattazione della materia viene condotta con rara competenza. Tutto ciò che interessa lo studioso sulla etiologia, clinica, parassitologia, anatomia patologica, immunologia e fattori epizootici, trova uno sviluppo vasto ed organico nello stesso tempo.

Ai singoli capitoli vengono aggiunti numerosi risultati sperimentali che completano la comprensione della materia.

Lo studio della terza parte è consacrato ai vari metodi di profilassi delle Piro plasmosi. Trovano giusto posto, in questa parte, i vari metodi di vaccinazione che costituiscono il frutto delle lunghe esperienze personali degli Autori e che rappresentano il fulcro della lotta contro le Piroplasmosi bovine. Una considerazione adeguata, a questo proposito, viene data anche all'uso del DDT. Esperienze sulla tossicità per gli animali e per le zecche, hanno permesso agli Autori di trovare una dose, letale-massima per gl'insetti e tossico-minima per gli animali, capace di esercitare una profilassi sui bovini per un periodo di circa sette giorni.

Nella quarta parte vengono trattati alcuni problemi di patologia generale in rapporto alle Piroplasmosi.

Questa interessante monografia non mancherà di incontrare presso gli studiosi dell'argomento l'interesse ed il favore che le vengono assicurati dalla profonda competenza di autori come il Sergent ed i suoi collaboratori e dalla completezza della trattazione.

F. Verolini

NOTIZIE

IL PIANO QUINQUENNALE DI RISANAMENTO DELL'ITALIA IN UNA CONFERENZA TENUTA ALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Nel gennaio 1946 il Prof. Missiroli in una conferenza tenuta nell'Istituto Superiore di Sanità espose i risultati da lui conseguiti col D.D.T. nelle pianure di Fondi durante l'estate 1945 ed il suo piano di risanamento dell'Italia in un periodo di cinque anni. Il numeroso uditorio accolse tale annunzio attonito e sorpreso; sembrava a molti impossibile sradicare dal suolo di Italia una malattia che per duemila anni aveva pesato tristamente su i suoi destini. Pochi osarono manifestare il loro entusiasmo per l'inatteso annunzio; fra questi va ricordato S. E. Solimena Segretario generale dell'Alto Commissariato per l'Igiene e Sanità Pubblica il cui nome sarà legato alla storica impresa da lui prontamente organizzata. Egli raccomandò subito all'UNRRA il piano predisposto dal Prof. Missiroli ed il primo gennaio di quest'anno si iniziavano i lavori previsti dal piano stesso. Centinaia di autocarri, dotati di una ricca attrezzatura, furono inviati nelle varie regioni malariche d'Italia ove il successo si delinea qaule era stato previsto. Fin d'ora si può affermare che la soppressione della trasmissione della malaria è stata conseguita in due terzi delle zone malariche d'Italia. Nel prossimo anno la trasmissione della malaria verrà soppressa in tutta Italia e nei tre anni successivi verrano curate le ultime recidive di terzana benigna.

Si prevede pertanto che l'ultimo caso di malaria in Italia verrà registrato entro il periodo fissato di cinque anni.

Si può dire che tutto il mondo è interessato a questa grande impresa, la cui riuscita segnerà l'inizio del risanamento del bacino del Mediterraneo e delle regioni dell'Africa verso cui attualmente si rivolge l'iniziativa europea.

LA RICERCA SCIENTIFICA DEL DOPO GUERRA.

Nel rapporto dell'attività svolta dalla Fondazione Rockefeller nel 1946 figurano alcuni capitoli di grande interesse sulla ricerca scientifica durante la guerra e dopo la guerra, su cui desidero richiamare l'attenzione dei nostri lettori.

La convinzione di molti che la guerra abbia contribuito ad accelerare il progresso scientifico è priva di fondamento. Oramai tutti convengono nel riconoscere che l'attività febbrile degli scienziati durante la guerra non è stata indirizzata alla ricerca, ma ad applicare le conoscenze già acquisite per risolvere problemi specifici e ristretti. All'uomo di scienza durante la guerra non rimase tempo per la ricerca pura e perciò i contributi alle nostre conoscenze sono rari e poco importanti.

Fra la scoperta scientifica e la sua applicazione pratica intercorre sempre un certo lasso di tempo; ora la guerra ha avuto per effetto di raccorciare questo periodo di tempo, cioè di procedere più rapidamente all'applicazione delle scoperte compiute dalla generazione precedente.

Non è dunque durante la guerra, ma durante la pace che il progresso scientifico, da non confondersi con le applicazioni della scienza, trova l'ambiente più propizio.

Non meno grave è stata l'influenza della guerra sulla buona formazione del personale scientifico che dovrà prendere in consegna la fiaccola della ricerca nel prossimo futuro. L'interruzione della ricerca scientifica e quindi dell'addestramento del personale destinato alla ricerca, rappresenta per l'avvenire un danno che non è stato ben valutato durante la guerra. L'utilizzazione di questo personale per la guerra costituisce un procedimento disperato che pone un'ipoteca paralizzante sull'avvenire scientifico di un paese; per alimentare per un giorno la macchina della guerra, sono stati bruciati i semi del progresso scientifico destinati a germogliare nella prossima generazione.

Attualmente esiste una penuria preoccupante di personale allenato alla ricerca. Per alcune branche quali la batteriologia, la biochimca, l'anatomia, la patologia generale, la fisiologia non è facile trovare uomini ancora giovani che abbiano le qualità necessarie per l'insegnamento e per la ricerca.

Solo la Russia e l'Inghilterra, anzichè ubbidire a considerazioni di bisogni immediati, furono guidate dalla visione lontana del loro avvenire. In Russia, durante la guerra, il personale destinato alla ricerca è stato conservato nei laboratori, e l'Inghilterra, non senza difficoltà naturalmente, è riuscita ad impedire l'interruzione nella formazione dei suoi futuri professori e ricercatori. L'amara esperienza di questa guerra ci deve indurre a considerare che un personale ben preparato costituisce per la scienza il capitale più prezioso e che è una follia criminale dissipare questo capitale.

Ma la guerra non ha soltanto distrutto, ma per molti anni ci ha isolati, ancora parzialmente. Il nostro sforzo, che non esito a definire eroico, di pubblicare la Rivista di Parassitologia, è stato suggerito dalla necessità di rompere l'isolamento del silenzio che impedisce il libero scambio di idee attraverso la frontiera.

E' difficile valutare quanto l'umanità ha perduto durante questi anni di silenzio e di oscurità intellettuale; d'altra parte ciò appartiene al passato. Attualmente il nostro dovere immediato è di ristabilire attraverso le frontiere i legami scientifici e culturali interrotti durante la guerra, e di riprendere il nostro cammino dai margini del sapere verso l'incognito.

La convinzione espressa da qualcuno che l'Europa come entità culturale sia ferita mortalmente senza speranza di risurrezione non è confermata dai rapporti pervenuti alla Fondazione Rockefeller. La vitalità intellettuale dell'Europa ha radici troppo profonde per essere distrutta senza possibilità di produrre nuovi e vigorosi germogli. L'Europa costituisce ancora il più grande centro di valori umani e di talento creatore, per cui il capitolo che la riguarda nella storia della civilizzazione è lontano dall'essere chiuso; essa non ha ancora finito di portare al progresso dell'umanità contributi ineguagliabili.

Perciò la Fondazione Rockefeller indirizzerà i suoi sforzi per facilitare la ripresa della ricerca scientifica e per rinnovare i legami che univano la vita intellettuale dell'Europa a quella di tutto il mondo.

L'Italia, il paese più duramente provato dalla guerra, attende con fervore alla ricostruzione dei suoi Istituti scientifici; speriamo che il governo possa dare i mezzi per riprendere la ricerca scientifica che in passato diede lustro a molti nostri Istituti e che non ci manchi ancora una volta l'aiuto degli amici della Fondazione Rockefeller.

Noi stessi ci apprestiamo a chiudere la parentesi di lavoro pratico destinato al risanamento dell'Italia dalla malaria, oramai ben avviato, per dedicare ancora tutta la nostra attività alla ricerca.

I contributi da noi portati alla conoscenza sull'epidemiologia della malaria costituiscono la base dell'attuale lavoro pratico di risanamento; altri campi occorre òra investigare non meno promettenti per la salute e la prosperità del nostro Paese.

A. Missiroli

NELL'ANNIVERSARIO DELLA MORTE DEL DOTT. ARNALDO GIOVANNOLA

Nove anni fa partiva per il Messico il nostro collaboratore Dottore Arnaldo Giovannola per compiere una serie di importanti ricerche in quelle regioni.

Era stato per tre anni nostro assistente, aveva frequentato per due anni l'Istituto d'Igiene di Baltimora ed aveva trascorso lungo tempo in Germania presso i laboratori della Bayer ed in Grecia con Barber; aveva quindi una superba preparazione scientifica e la missione che gli era stata affidata sarebbe stata indubbiamente fruttifera.

La morte lo colse pochi giorni dopo il suo arrivo a Città del Messico ove la sua fine suscitò una profonda impressione.

Nel riprendere la pubblicazione della Rivista di Parassitologia, alla cui fondazione Giovannola diede un forte contributo, ricordiamo con rimpianto il suo primo Redattore.

A. M.

Prof. A. Missiroli, *Direttore responsabile*

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma, Via della Guardiola, 22

SOMMARIO

BOSCARDI F. - Studi sullo sviluppo e sulla struttura di *Schistosoma haematobium* nel mollusco ospite intermedio . . . . Pag. 67
SPENA A. - Contributo allo studio della toxoplasmosi e considerazioni sulle diverse specie che costituiscono il genere *Toxoplasma* . . . . » 85
BOSCARDI F. - Su di una metacercaria di *Echinostoma* riscontrata in *Bulinus contortus* e in *Physopsis africana* nel Fezzan (Sahara libico) . . . . » 105
RITA G. - Contributo allo studio della sierodiagnosi nell'amebiasi » 113
RITA G. e GRAMICCIA G. - Ricerche sulla infezione degli embrioni di pollo con *Plasmodium gallinaceum* (I nota) . . . . . » 119
MOSNA E. - Su una caratteristica biologica del *Culex pipiens autogenicus* di Latina . . . . » 125
SACCÀ G. - Sull'esistenza di mosche domestiche resistenti al DDT » 127
BETTINI S. e TENTORI L. - Insetti e vitamine (I. Rivista sintetica. II. Vitamine A ed E nell'*Anopheles labranchiae* var. *atroparvus*) » 129
MISSIROLI A. - Riduzione o eradicazione degli anofeli? . . . . » 141
Recensioni . . . . » 171
Notizie . . . . » 173

LA RIVISTA DI PARASSITOLOGIA si pubblica quattro volte all'anno. Raccoglie contributi originali delle tre branche della parassitologia animale: *Protozoologia*, *Elmintologia* ed *Entomologia*. Pubblica lavori di parassitologia generale e di biologia dei parassiti dell'uomo, degli animali e anche delle piante. Raccoglie ancora lavori importanti di *Micologia*.

Direzione e Amministrazione: Via Carlo Fea, 15 - ROMA

	Italia	Estero
Abbonamento annuo	L. 1000 —	L. 2000 —
Un numero separato	» 300 —	» 600 —

Printed in Italy